



Contribution à l'étude des gènes Vestigial

Emilie Simon

► To cite this version:

Emilie Simon. Contribution à l'étude des gènes Vestigial. Biologie cellulaire. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0213 . tel-01273079

HAL Id: tel-01273079

<https://theses.hal.science/tel-01273079>

Submitted on 11 Feb 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité : Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Par Emilie SIMON

Contribution à l'étude des gènes *Vestigial*

Sous la direction de Pierre THIÉBAUD

Soutenue le 24 novembre 2015 à 14h00

Membres du jury :

M. le Professeur Martin TEICHMANN

Président

Mme le Docteur Catherine LECLERC

Rapporteur

M. le Professeur Éric BELLEFROID

Rapporteur

M. le Professeur Alain ZIDER

Examineur

M. le Docteur Pierre THIÉBAUD

Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier les membres du jury : Martin Teichmann, Catherine Leclerc, Eric Bellefroid et Alain Zider. C'est un honneur pour moi que vous ayez accepté si rapidement de juger mon travail de thèse.

Je souhaite remercier le laboratoire UMR CNRS 5164 qui m'a accueillie pendant ma thèse, et plus particulièrement les membres de l'équipe qui m'ont encadrée.

Tout d'abord mille merci à **Pierre**, merci de m'avoir encadrée et soutenue pendant ces années. Merci pour ta présence, ta gentillesse, ta bonne humeur, ton soutien et ta confiance. Je te remercie aussi pour toutes nos discussions cinématographiques, littéraires, scientifiques et aussi personnelles qui ont su rendre les micro-injections très enrichissantes et plus « fun ». Merci tout simplement pour t'être aussi bien occupé de moi et m'avoir fait grandir. Je remercie aussi **Nadine**, merci pour vos conseils, votre gentillesse, votre disponibilité malgré un emploi du temps chargé, votre encadrement et votre grande aide tout au long de ces années.

Corinne merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir formée quand j'étais « petite ». Merci de m'avoir permis de faire mes premiers pas dans le monde merveilleux du crapaud. Merci pour ton écoute et ton aide.

Un grand merci à **Sandrine**, quel bonheur d'avoir travaillé avec toi pendant ces années. Merci pour ton rire, tes blagues, ton écoute, ton soutien et aussi tes conseils scientifiques ou non. Nos fous rire, nos danses, nos imitations, nos virées shopping m'ont permis de venir au labo tous les jours (enfin presque !) avec le sourire. Enfin merci pour ta gentillesse et ton amitié. Spéciale dédicace à « ton Nico » et tes deux merveilleux Loulous.

Alice, tu m'as accompagnée pendant mes deux premières années de thèse, merci pour ta bonne humeur, ton écoute et ton aide. Merci pour nos soirées à l'Autre Petit Bois, les spectacles au Grand Théâtre, les cours de zumba et tous nos trajets à pieds ou en bus. Merci pour ton amitié et tes attentions pendant ces années.

Aya, mon acolyte de thèse pendant ces trois ans, une belle rencontre. Merci pour ta gentillesse, ton écoute et ton soutien pendant les périodes difficiles. Nous avons commencé cette aventure ensemble, nous nous sommes soutenues et nous allons la finir (et la réussir) ensemble.

Camille, merci pour ton écoute, ton soutien et tes encouragements.

Inès, merci pour ton bref mais ô combien remarqué passage au labo. Merci pour ta bonne humeur, tes blagues et tes « ralleries ».

Aurélié merci pour ta bonne humeur quotidienne, tes potins, ton rire et tes coups de gueule mémorables.

Phillipe V merci pour ta bonne humeur et ta gentillesse.

Phillipe B merci pour tes passages dans le bureau, tes blagues (pas toujours bien comprises !) et ta gentillesse.

Merci à tous les **TBM doc's** qui m'ont permis de m'aérer l'esprit et de voir la thèse autrement.

Je tiens également à remercier mes amies les plus chères qui ont été présentes pour moi :

Marie, huit années maintenant qu'on forme le meilleur binôme de tous les temps. La vie nous a séparées mais la distance n'aura pas eu raison de nous, et aura renforcée cette amitié ! Merci tout simplement d'être là pour moi chaque jour depuis toutes ces années.

Anne-Sophie, treize ans maintenant qu'on se connaît. Merci pour ton soutien et tes encouragements, là encore la distance ne nous a pas fait peur. On en aura partagé ensemble des aventures !

Merci à tous les autres qui ont été présents et qui m'ont soutenue.

Enfin je remercie ma famille, en particulier ma petite mamie et mes **parents**, les meilleurs du monde, pour leur soutien, leur confiance et leur amour sans faille, sans qui je ne serai jamais arrivée jusqu'ici.

Et merci à mon **Anto**, merci d'être là pour moi, pour tout ce que tu m'apportes, de ton aide et de ta grande patience. Merci de partager ma vie depuis maintenant quelques années.

Sommaire

Abréviations.....	7
Avant-propos	11
Introduction.....	15
I. Les gènes de la famille Vestigial.....	17
A. Historique	17
B. Evolution des gènes <i>vestigial</i>	21
1. Deux sous-familles de protéines à domaine Tondu	21
2. Données phylogénétiques.....	23
3. Le domaine Tondu comme unité de base fonctionnelle de l'évolution des protéines Vestigial.....	27
C. Structure, expression et fonction des gènes de la sous-famille contenant un domaine Tondu	31
1. Le gène <i>vestigial</i> de drosophile.....	33
2. <i>Vestigial-like 1</i> (TONDU).....	37
3. <i>Vestigial-like 2</i> (VITO-1).....	39
4. <i>Vestigial-like 3</i> (VITO-2).....	43
5. Les gènes <i>Vestigial-like</i> chez les invertébrés.....	47
D. Structure, expression et fonction des gènes de la sous-famille contenant deux domaines Tondu	49
1. Les gènes <i>vestigial-like 4</i> chez les vertébrés	49
2. Les gènes <i>Vestigial-like 4 like</i> chez les vertébrés	53
3. Le gène <i>Tgi</i> de drosophile, orthologue du gène <i>Vestigial-like 4</i>	53
4. Les gènes <i>Vestigial-like 4</i> chez les invertébrés hormis la drosophile....	56
II. Les protéines TEAD et leurs cofacteurs.....	59
A. Les protéines TEAD dans les différents organismes.....	61
1. Les protéines TEAD chez les mammifères	61
a. TEAD1	61

b.	TEAD2	63
c.	TEAD3	63
d.	TEAD4	65
2.	Les protéines TEAD dans les autres organismes	65
B.	Les cofacteurs des protéines TEAD	67
1.	Les cofacteurs de TEAD impliqués dans la conformation de la chromatine	68
2.	Les cofacteurs de TEAD se fixant à l'ADN	68
3.	Les cofacteurs de TEAD conférant une activité transcriptionnelle	69
a.	YAP1	69
b.	TAZ	73
C.	Implication des protéines TEAD et de leurs cofacteurs dans le cancer	74
1.	La protéine TEAD1 et le cancer	74
2.	Implication des cofacteurs des protéines TEAD dans le cancer	75
a.	Les protéines YAP1 et TAZ	75
b.	Les protéines vestigial-like	77
III.	La voie de signalisation Hippo	79
A.	La voie Hippo chez la drosophile	79
B.	La voie Hippo chez les mammifères	83
C.	Régulation de la voie Hippo	87
1.	La régulation de la polarité apico-basale	87
2.	La polarité cellulaire planaire	91
3.	Les récepteurs couplés aux protéines G	93
4.	La matrice extracellulaire et le cytosquelette	94
D.	Les différentes fonctions de la voie Hippo	97
1.	Les fonctions de la voie Hippo dans de multiples processus physiologiques	97
2.	La voie Hippo et le contrôle de la taille des organes	99

3.	La voie Hippo comme suppresseur de tumeurs.....	99
IV.	Mise en place du système nerveux.....	105
A.	Le modèle amphibien <i>Xenopus laevis</i>	105
1.	Les avantages du modèle	107
2.	Le développement du xénope.....	107
a.	La fécondation	109
b.	La segmentation	109
c.	La gastrulation	111
d.	La neurulation	111
e.	L'organogenèse	113
B.	Mécanismes moléculaires impliqués lors de l'induction neurale	113
1.	La nature moléculaire de l'inducteur neural	115
2.	Le contrôle de la neurogenèse : cascade d'activation des gènes proneuraux et inhibition latérale	119
3.	La régionalisation du tissu neural.....	123
a.	Fonctions des gènes Hox	125
b.	Implications des autres voies dans la régionalisation	127
c.	La régionalisation dorso-ventrale.....	127
4.	Induction et spécifications des placodes.....	129
C.	La neurogenèse post-embryonnaire et adulte.....	130
V.	Le développement de la crête neurale.....	133
A.	Les mécanismes d'induction de la crête neurale.....	133
1.	Les sources des signaux d'induction	135
2.	Les voies de signalisation extracellulaires	136
3.	Les gènes marqueurs de la bordure de la plaque neurale	139
4.	Les gènes spécifiques de la crête neurale	141
B.	La migration de la crête neurale.....	143

1. La transition épithélium-mésenchyme.....	143
2. La migration des cellules de la crête neurale	145
a. La crête neurale céphalique	147
b. La crête neurale troncale	147
3. Les dérivés des cellules de la crête neurale	149
C. Crête neurale et pathologies	149
Objectifs de thèse	153
Résultats.....	157
Chapitre 1 : <i>Vestigial-like-4</i> régule la neurogenèse et la formation des cellules de la crête neurale	159
Résumé des travaux.....	159
Article 1	161
Discussion	197
Chapitre 2 : <i>Vestigial-like 3</i> est impliqué dans la migration de la crête neurale et la formation du nerf trijumeau	213
Résumé des travaux.....	213
Article 2	215
Discussion	257
Conclusion générale	269
Références	275
Annexes.....	309
Annexe 1 : Revue soumise à IJDB	311
Annexe 2 : Matériels et Méthodes.....	343
Annexe 3 : <i>Curriculum vitae</i> scientifique	367

Abréviations

aa : acide aminé

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

AMOT : angiomotine

aPKC : atypica Protein Kinase C

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATTS : Abaa, TEC1, TEF-1 Sequences

bHLH : basic Helix Loop Helix

BMP : Bone Morphogenetic Protein

BSA : Bovin Serum Albumin

CaCl₂ : Chlorure de calcium

Ca(NO₃)₂ : Nitrate de calcium

CN : Crête Neurale

cm : centimètre

Dpp : Decapentaplegic

Ds : Dachsous

EDTA : EthyleneDiamineTetraAcetic acid

ERBB-4 : V-ERB-A erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4

ERK : Extracellular signal Regulated Kinase

E(spl)-C : Enhancer of split complex

Ex : Expanded

FERM : F pour Protein4 .1, Erzin, Radixin, Moesin

FGF : Fibroblast Growth Factor

FGFR : FGF Receptor

Fj : Four-jointed

Fmi : Flamingo

Ft : Fat

Fz : Frizzled

GPCR : G Protein Coupled Receptor

h : heure

HCl : Hydroxyde de Chlore

HEPES : Acide sulfonique N-2-hydroxyethylpiperazine-N'2 ethane

Hpo : Hippo

HRP : HorseRadish Peroxydase

KCl : Chlorure de potassium

LATS1 : Large Tumor Suppressor kinases

LTR : Long Terminal Repeat

MADS : Mcm1 AGAMOUS DEFICIENS SRF

MAP kinase : Mitogen Activated Protein kinase

MBT : Mid *Blastula* Transition

MCAT : Muscle CAT

MEC : Matrice Extracellulaire

MEF2 : Myocyte Enhancer Factor

Mer : Merlin

MgCl₂ : Chlorure de Magnésium

MgSO₄ : Sulfate de Magnésium

min : minute

miR : micro RNA

MMPs : Métalloprotéases

MMR : Marc's Modified Ringers

MMTV : Mouse Mammary Tumor Virus

Mo : Morpholino	TAZ : Transcriptional coActivator with PDZ binding motif
MOPS : 3-propane-1-sulfonic acid	TBD : TEAD Binding Domain
MST : Mammalian Ste20-like Protein Kinase	TEA : TEF-1 ou TEC1, Abaa
NaCl : Chlorure de Sodium	TEAD : TEA Domain
NCAM : Neural Cell Adhesion Molecule	TEM : Transition Epithelium Mesenchyme
ODC : Ornithine Décarboxylase	TEMED : N,N,N',N'-Tétraméthyléthylènediamine
PA : Pôle Animal	TGFβ : Transforming Growth Factor-β
PAGE : PolyAcrylamide Gel Electrophoresis	Tgi : Tondu-Domain-containing Growth Inhibitor
PARP : Poly ADP-Ribose Polymérase	TZF : Tandem Zinc Finger
PAS : PerArntSlim	UBA : Ubiquitin-Associated motif
PBS : Phosphate-Buffered Saline	UTR : UnTranslated Region
PCP : Planar Cell Polarity	Vg : Vestigial
PCR : Polymerase Chain Reaction	VGLL : Vestigial-like
PV : Pôle Végétatif	WW45 : WW domain containing protein 45 kDa molecular mass
RT-PCR : RetroTranscription-Polymerase Chain Reaction	Wts : Warts
r : rhombomères	xNgnr-1 : Xenopus Neurogenin related
RUNX : RUNtrelated transcription factor	YAP1 : Yes-Associated Protein 1
Sav : Salvador	YBD : YAP1 Binding Domain
Sd : Scalloped	Yki : Yorkie
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate	
Shh : Sonic hedgehog	
Sox : Sry-Related HMG box	
SRC : Steroid Receptor Coactivator	
SRF : Serum Responsive Factor	
SSC : Standard Sodium Citrate	
STE20 : Sterile 20	
SV40 : Simian Virus 40	

Avant-propos

Les espèces animales présentent une diversité et une complexité tout à fait remarquables, non seulement du point de vue de leur forme mais aussi de leur mode de développement. Une avancée spectaculaire dans le domaine de la biologie du développement a été de découvrir que la plupart des espèces, aussi différentes soient elles, avaient en commun un ensemble de gènes régulateurs du développement très conservés au cours de l'évolution. Ces gènes constituent en quelque sorte une boîte à outils (ou toolkit pour les anglo-saxons) qui permet la construction de l'organisme selon un programme génétique qui assure la stabilité des propriétés biologiques des cellules et des tissus qui le constituent. Pour la plupart, ces gènes régulateurs ont été caractérisés à l'origine chez la drosophile, et parmi ceux-ci, a été définie la classe des gènes sélecteurs qui orchestrent la formation de structures entières comme par exemple le gène *vestigial* qui contrôle la formation de l'aile. Qu'en est-il du gène *vestigial* dans les différentes espèces animales, comment est-il exprimé et quelles sont ses fonctions ? La problématique ainsi posée ne peut se résoudre de manière globale mais repose plutôt sur une approche expérimentale qui privilégie un modèle animal permettant de fournir des éléments de réponses pour ensuite les intégrer dans un modèle plus général.

L'objectif de ma thèse a été d'étudier la fonction de deux gènes *vestigial*, les gènes *vestigial-like 3* et *vestigial-like 4*, dans le modèle amphibien xénope. Ce choix découle d'une part, des travaux antérieurs de notre équipe qui a caractérisé la famille des gènes *vestigial* chez le xénope et d'autre part des avantages de ce modèle expérimental qui permet les analyses cellulaires et moléculaires. Mon mémoire de thèse se présente sous forme d'une introduction, suivie de deux chapitres consacrés aux résultats expérimentaux sur les gènes étudiés et d'une conclusion générale.

L'introduction du mémoire est structurée en cinq parties distinctes. La première partie constitue l'état de l'art de nos connaissances sur la famille des gènes *vestigial*, en termes de répertoire des gènes présents dans les différents groupes d'animaux, leur structure et lorsqu'elle a été décrite, leur fonction. Ceci fait l'objet d'une revue soumise pour publication, la première à ce jour dans la littérature, qui intègre les données sur cette famille de gènes dans un contexte plus large d'évolution.

La deuxième partie décrit les protéines TEAD, qui en se liant aux protéines vestigial, forment un complexe transcriptionnel spécifique. La troisième partie porte sur la voie de signalisation Hippo qui a été décrite très récemment comme pouvant être régulée par les protéines vestigial aussi bien chez la drosophile que dans les cellules de mammifères. Les deux gènes *vestigial* auxquels je me suis intéressés durant ma thèse sont exprimés dans le cerveau et les crêtes neurales de l'embryon de xénope; c'est pourquoi les quatrième et cinquième parties portent sur l'état de nos connaissances quant à la mise en place du système nerveux et des crêtes neurales au cours du développement.

La partie résultats du mémoire est constituée d'un chapitre consacré aux travaux effectués sur le gène *vestigial-like 3* et un chapitre consacré au gène *vestigial-like 4*. Les résultats font l'objet de publications en préparation et sont présentés comme telles avec, en plus pour chacun des chapitres, un résumé de l'article et une discussion.

Une conclusion générale clôt le mémoire. Une annexe comprenant la revue soumise sur les gènes *vestigial*, un chapitre décrivant Matériels et Méthodes utilisés et un *curriculum vitae* est présentée à la fin du mémoire.

Introduction

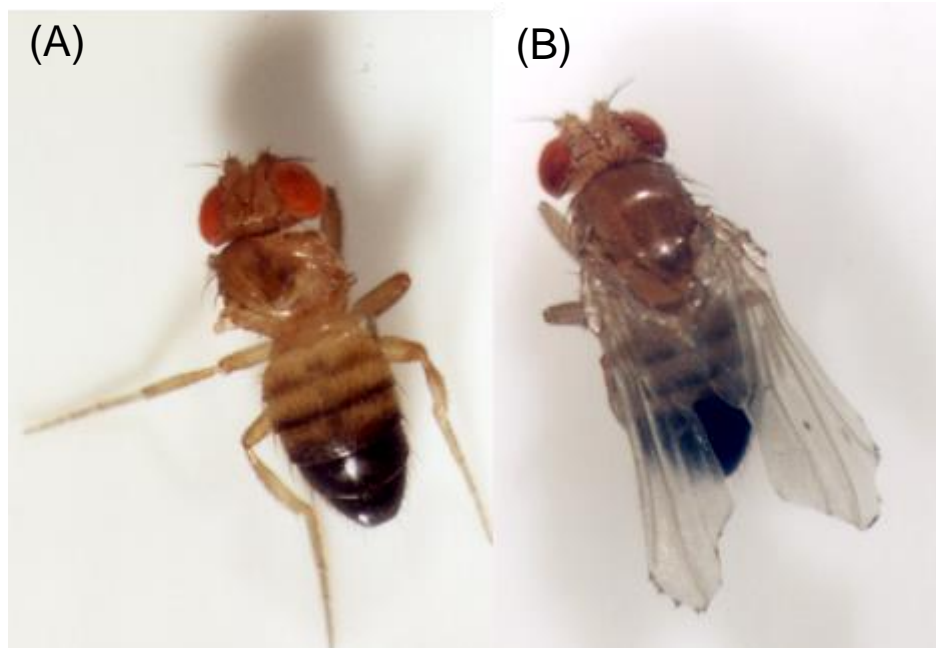


Figure 1 : Vestigial est nécessaire à la formation des ailes chez la drosophile.

(A) Drosophile avec une mutation homozygote nulle pour *vg*. La drosophile avec le gène *vg* muté ne présente plus d'ailes ni d'haltères.

(B) Drosophile avec une mutation hypomorphe *vg79d5* qui présente des ailes encochées (Images généreusement données par Alain Zider).

I. Les gènes de la famille Vestigial

A. Historique

Thomas Morgan et Calvin Bridges ont décrit en 1919 un mutant spontané de drosophile avec des ailes réduites à des vestiges (Figure 1) (Bridges et Morgan, 1919). Ce mutant a été nommé *vestigial* (*vg*) et un grand nombre d'allèles du gène a été caractérisé par la suite (Lindsey and Grell, 1968). Il a été montré que la protéine Vestigial (Vg) était nécessaire à la formation de l'aile et cette propriété dépendait strictement de son association avec le facteur de transcription Scalloped (Sd) initialement identifié chez les mammifères et qui code une protéine possédant le domaine de liaison à l'ADN appelé TEA (TE pour **TEF**-1 et **TEC**1, A pour **Abaa**) ou ATTS (pour **Abaa**, **TEC**1, **TEF**-1 Sequences) (Andrianopoulos and Timberlake, 1991; Burglin, 1991; Halder et al., 1998; Kim et al., 1996; Xiao et al., 1991). Les protéines possédant le domaine TEA sont appelées TEAD (pour **TEA** Domain). Le complexe protéique Vg-Sd se lie à l'ADN sur une séquence de reconnaissance particulière via le domaine TEA de Sd et la protéine Vg fonctionne comme un transactivateur, activant ainsi des gènes spécifiques du réseau qui régule le développement des ailes (Halder et al., 1998; Williams et al., 1991). D'après leurs propriétés, *vg* et *sd* appartiennent à la classe des gènes sélecteurs, dont la fonction est de gouverner le destin d'un groupe de cellules dans l'embryon (Garcia-Bellido, 1975; Mann and Carroll, 2002). Une protéine humaine homologue de la protéine Vg a été identifiée en 1999; elle a été nommée initialement TONDU et elle est capable de remplacer Vg pour la formation de l'aile (Vaudin et al., 1999). La comparaison entre les séquences protéiques TONDU et Vg fait apparaître une région conservée de 24 acides aminés qui permet l'interaction entre les protéines Vestigial (ou TONDU) et Sd (ou TEAD). Cette région constitue le domaine Tondou (ou TDU). En accord avec la nomenclature internationale (<http://www.genenames.org/>), la protéine TONDU a été renommée Vestigial-like 1 (ou VGLL1) et constitue le premier membre de la famille des homologues de Vg qui comporte quatre membres chez les vertébrés (ou Vgll1-4). Depuis sa caractérisation chez la drosophile, les gènes *Vestigial-like* ont été décrits chez plusieurs vertébrés et pour certains d'entre eux des propriétés fonctionnelles ont été proposées.

De par leur interaction avec les protéines TEAD, les protéines Vestigial-like sont supposées contrôler plusieurs processus cellulaires. Les protéines TEAD sont codées par une famille de gènes comprenant quatre membres chez les mammifères (*TEAD1-4*), TEAD1 étant la protéine fondatrice de cette famille initialement décrit comme activateur transcriptionnel (TEF-1) du virus simien 40 (SV40) (Xiao et al., 1991). Les protéines de la famille TEAD ont des fonctions pléiotropes qui dépendent du type cellulaire, des contextes de développement ou des partenaires d'interaction. Ces protéines régulent des processus cellulaires importants comme la différenciation, la prolifération ou le maintien des cellules souches et elles ont aussi un rôle dans le cancer (Pobbati and Hong, 2013). Cette dernière fonction est principalement liée à la voie Hippo dans laquelle les protéines TEAD interagissent avec la protéine YAP1 (homologue de la protéine Yorkie de drosophile), l'effecteur transcriptionnel de cette voie qui régule la croissance cellulaire et la transformation oncogénique (Harvey et al., 2013).

Tandis que de nombreuses connaissances ont été accumulées sur les fonctions des protéines TEAD chez les vertébrés, il y a encore très peu d'informations sur les protéines Vestigial-like hormis des fonctions pléiotropes dans le développement et des pathologies notamment le cancer. En effet, une étude récente chez la drosophile a identifié une protéine corépresseur de Sd, nommé Tgi, l'orthologue de la protéine Vgll4 de mammifère, pouvant supprimer la croissance des tissus induite par la protéine YAP1 (Koontz et al., 2013).

Nomenclature					
Drosophila		<i>vg/Vg</i> (1)		<i>tgi/ Tgi</i> (2) <i>SdBP</i> (3)	
Human	<i>VGLL1/VGLL1</i> <i>TONDU</i> (4)	<i>VGLL2/VGLL2</i> <i>Vgl-2</i> (5), <i>VITO-1</i> (6)	<i>VGLL3/VGLL3</i> <i>Vgl-3</i> (5), <i>VITO-2</i> (7)	<i>VGLL4/VGLL4</i> <i>Vgl-4</i> (8)	
Mouse	<i>Vgl1/VGLL1</i> <i>Vgl-1</i> (5)	<i>Vgl2/VGLL2</i> <i>Vgl-2</i> (5), <i>VITO-1</i> (6)	<i>Vgl3/VGLL3</i> <i>Vgl-3</i> (5), <i>VITO-2</i> (7)	<i>Vgl4/VGLL4</i> <i>Vgl-4</i> (8)	
Chicken	<i>VGLL1/VGLL1*</i>	<i>VGLL2/VGLL2</i> <i>Vgl-2</i> (9)	<i>VGLL3/VGLL3*</i>	<i>VGLL4/VGLL4*</i>	
Xenopus	<i>vgl1/Vgl1</i> (10)	<i>vgl2/Vgl2</i> (10)	<i>vgl3/Vgl3</i> (10)	<i>vgl4/Vgl4</i> (10)	<i>vgl4l/Vgl4l</i> (11)
Zebrafish	<i>vgl1/Vgl1*</i>	<i>vgl2/Vgl2</i> <i>vgl-2a</i> , <i>vgl-2b</i> (12)	<i>vgl3/Vgl3*</i>	<i>vgl4/Vgl4</i> (13)	<i>vgl4l/Vgl4l</i> (13)

Tableau 1 : Inventaire des membres de la famille vestigial-like chez les vertébrés et la drosophile.

Les noms standardisés selon les guides de nomenclature sont présentés. Le nom donné après identification du cDNA ou le clonage du gène est indiqué en dessous en bleu avec les références correspondantes. Les gènes non référencés (*) ont été identifiés dans les banques de données et présentent une conservation dans la synténie. *SdBP* (**S**calloped-**B**inding-**P**rotein), *tgi* (**T**ONDU-domain-containing **G**rowth **I**nhibitor), *vg* (vestigial), *Vgl* et *Vgl* (vestigial-like), *VITO* (vestigial and Tondou related). (1) (Williams and Bell, 1988), (2) (Koontz et al., 2013), (3) (Guo et al., 2013), (4) (Vaudin et al., 1999), (5) (Maeda et al., 2002), (6) (Mielcarek et al., 2002), (7) (Mielcarek et al., 2009), (8) (Chen et al., 2004b), (9) (Bonnet et al., 2010), (10) (Faucheux et al., 2010). (11) (Barrionuevo et al., 2014), (12) (Mann et al., 2007), (13) (Melvin et al., 2013). Les lignes directrices pour les nomenclatures chez les différentes espèces sont comme suit : Drosophile (www.flybase.org) ; humain (www.genename.org) ; souris (www.informatics.jax.org) ; poulet (www.birdgenenames.org) ; xénope (www.xenbase.org) et poisson zèbre (www.zfin.org). En accord avec ces instructions, les gènes mais pas les protéines sont en italique. (Extrait de Simon et al., 2015)

B. Evolution des gènes *vestigial*

1. Deux sous-familles de protéines à domaine Tondu

Vestigial (Vg) a été décrit à l'origine chez la drosophile comme une protéine nucléaire capable de contrôler le développement des ailes et des haltères *via* son interaction avec la protéine Scalloped (Sd), qui appartient à la famille des facteurs de transcription TEAD (Halder et al., 1998; Williams et al., 1991). Sachant que la protéine de mammifère TEAD1 peut interagir avec la protéine Vg et se substituer à Sd pour la formation des ailes, il a été postulé l'existence d'une protéine équivalente à Vg chez les mammifères (Deshpande et al., 1997; Simmonds et al., 1998). Le premier orthologue identifié a été la protéine TONDU (ou Vestigial-like 1), décrite chez l'humain et qui contient un domaine de 24 acides aminés, appelé domaine Tondu, homologue au domaine de la protéine Vg requis pour son interaction avec la protéine Sd (Vaudin et al., 1999). Des protéines homologues à la protéine humaine VGLL1 ont également été décrites chez la souris et le xénope (Fauchaux et al., 2010; Maeda et al., 2002). Par la suite, deux autres protéines, VGLL2 et VGLL3, contenant un domaine Tondu ont été identifiées chez l'homme, la souris, le poulet, le xénope et le poisson-zèbre (Bonnet et al., 2010; Fauchaux et al., 2010; Maeda et al., 2002a; Mann et al., 2007; Mielcarek et al., 2002a; Mielcarek et al., 2009) (Tableau 1). La présence des trois gènes paralogues *VGLL 1-3* chez les vertébrés correspond à la duplication du génome qui a eu lieu durant l'évolution du génome des vertébrés (Panopoulou et al., 2003). Par ailleurs, cette complexification est illustrée par la situation chez le poisson-zèbre. En effet, deux gènes *vgll2* (*vgll2a* et *vgll2b*) ont été décrits dans cette espèce (Johnson et al., 2011; Mann et al., 2007) (Tableau 1). Ils proviennent de la duplication du génome survenue dans le lignage des téléostéens après la séparation avec le lignage des tétrapodes (Hoegg et al., 2004; Jaillon et al., 2004). VGLL1, VGLL2 et VGLL3 possèdent un seul domaine Tondu et constituent une des deux sous-familles de protéines de la famille Vestigial.

La seconde sous-famille correspond à des protéines qui possèdent deux domaines Tondu. L'archétype de cette sous-famille est la protéine VGLL4 identifiée initialement chez l'humain et la souris *via* la recherche de domaines Tondu dans les banques de données (Chen et al., 2004b). La protéine VGLL4 possède deux domaines Tondu (ou TDU1 et TDU2) de 10 acides aminés chacun et qui sont homologues à la région C-terminale du domaine Tondu des protéines VGLL1-3 (Chen et al., 2004b).

Chez l'amphibien xénope, quatre gènes *vestigial-like*, qui sont les orthologues des gènes de mammifères, ont été décrits (Faucheux et al., 2010). Un cinquième gène, nommé *vgll4-like (vgll4l)*, codant une protéine avec deux domaines Tondu mais ayant une identité limitée avec la protéine Vgll4, a été caractérisé chez l'amphibien (Barrionuevo et al., 2014) (Tableau 1). A ce jour, il n'y a pas d'équivalent de ce gène chez les aviaires ou les mammifères mais il a été identifié chez le poisson-zèbre (Melvin et al., 2013) (Tableau 1). Les gènes *vgll4l* correspondent à des événements de duplication qui ont eu lieu dans les lignages amphibiens et poissons. Chez la drosophile, jusqu'à très récemment, aucune protéine possédant deux domaines Tondu n'avait été caractérisée. Cependant, une telle protéine a été identifiée dans un criblage visant à isoler de nouveaux composants de la voie Hippo ou des partenaires de la protéine Sd. Cette protéine, nommée Tgi (pour Tondu-domain containing Growth Inhibitor) ou SdBP (pour Scalloped-Binding-Protein), contient deux domaines Tondu (TDU1 et TDU2) identiques aux domaines Tondu de VGLL4 humain et peut interagir avec la protéine Sd (Guo et al., 2013; Koontz et al., 2013) (Tableau 1). La protéine Tgi est l'homologue de la protéine Vgll4 de mammifère et agit comme un cofacteur impliqué dans la répression des gènes cibles de la voie Hippo (Guo et al., 2013; Koontz et al., 2013). Une analyse phylogénétique a confirmé le regroupement de la protéine Tgi avec la protéine VGLL4 et de la protéine Vg avec les protéines VGLL1, 2 et 3 (Koontz et al., 2013).

2. Données phylogénétiques

Il y a désormais un nombre croissant de séquences génomiques disponibles permettant l'étude de l'histoire de l'évolution des familles de gènes.

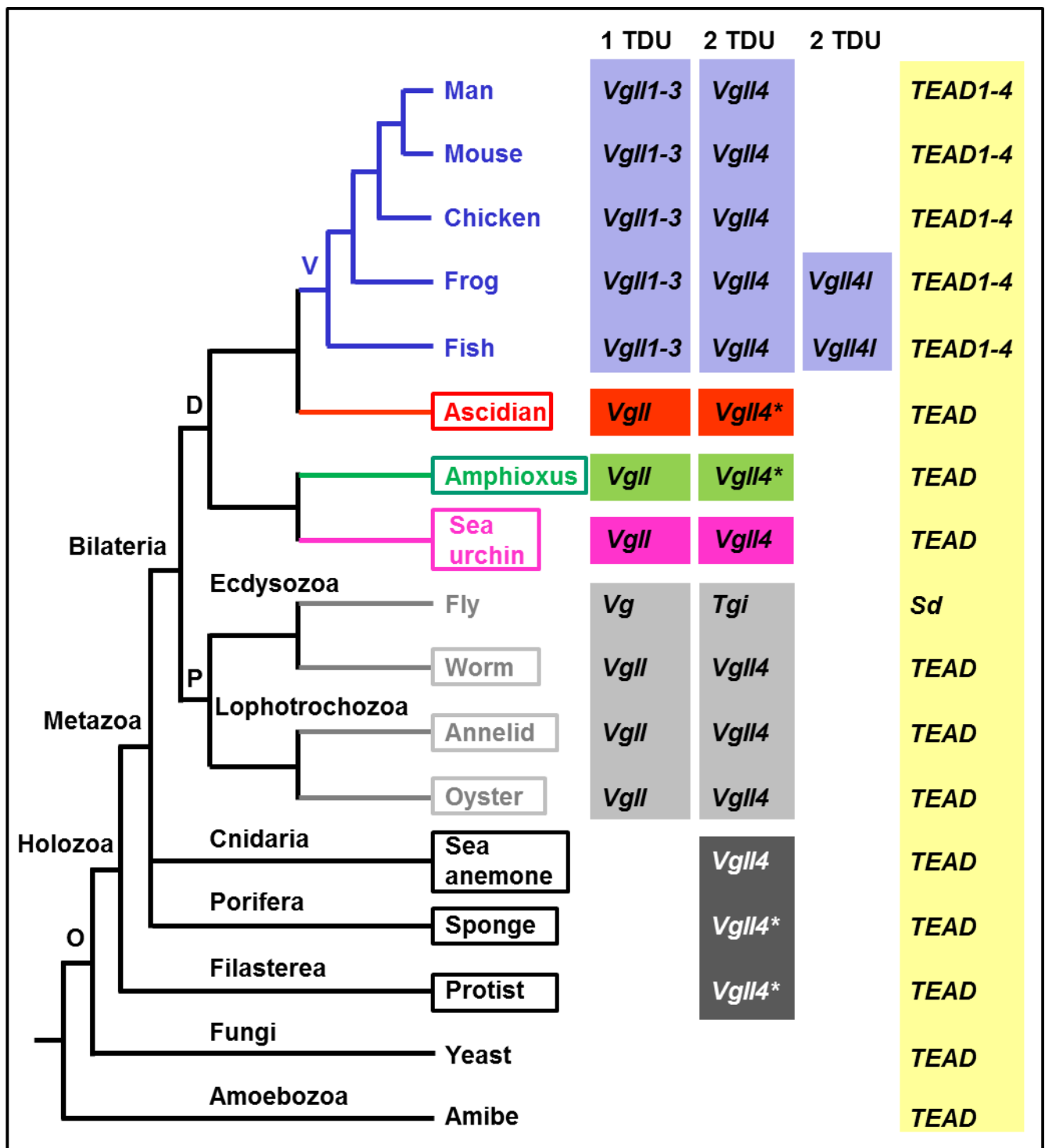


Figure 2 : Arbre phylogénétique montrant la distribution des protéines Vestigial-like et TEAD.

Les espèces encadrées (en bleu) indiquent les séquences identifiées dans les banques de données (Simon et al, 2015).

Au-delà des données publiées sur les gènes *Vestigial* (voir § 1.), les protéines à domaine Tondu dans différentes espèces représentatives ont été recherchées dans les banques de données afin d'établir un arbre phylogénétique (Figure 2) (Simon et al, 2015).

Cet arbre vient en complément de ceux établis par Fauchaux et al. et Koontz et al (Fauchaux et al., 2010; Koontz et al., 2013). Fauchaux et al. avaient établi un arbre phylogénétique dans lequel la protéine Vg de drosophile, contenant un seul domaine Tondu, correspondait à l'ancêtre des protéines de vertébrés VGLL1-3 alors que la protéine VGLL4 était apparentée au produit d'un gène de drosophile (NP648658) initialement décrit par Chen et al. en 2004 et qui s'est avéré par la suite être la protéine Tgi (Chen et al., 2004b; Koontz et al., 2013).

L'analyse des banques de données a confirmé la présence de quatre gènes *VGLL1-4* chez les vertébrés. Ceci a permis de caractériser les gènes non encore identifiés à ce jour chez le poulet (*VGLL1, 3, 4*) et chez le poisson zèbre (*vgll1, 3, 4*) (voir * Tableau 1). Au total, 15 régions génomiques ou clones ADNc codant une protéine à domaine Tondu ont été décrits dans différentes espèces depuis les protistes jusqu'à l'ascidie couvrant les principaux clades (voir cadres dans la Figure 2, Simon et al. 2015). L'ensemble de ces données a permis d'établir la présence des protéines avec un ou deux domaines Tondu dans l'arbre phylogénétique (Figure 2).

La première sous-famille de gènes *Vestigial-like* code des protéines contenant un seul domaine Tondu, comme les protéines *Vgll1-3* ou la protéine Vg de drosophile. Les gènes ont été identifiés uniquement chez les métazoaires et plus spécifiquement chez les bilatériens. En effet, ils ne sont pas trouvés dans l'anémone (cnidaire) ni chez l'éponge (porifera). Au cours de la diversification des bilatériens, le nombre de gènes de cette sous-famille passe de un, chez les espèces basales (*Vgll*, en gris), à trois chez les mammifères (*Vgll1-3*). Ceci est lié aux événements de duplication de génomes qui ont eu lieu au cours de l'évolution des vertébrés (Dehal and Boore, 2005).

La seconde sous-famille de gènes *Vestigial-like* code des protéines avec deux domaines Tondu (*Vgll4/Tgi*). Ces gènes ont été identifiés non seulement chez les bilatériens mais également chez les cnidaires, les spongiaires et les protistes indiquant pour ces derniers une origine pré-métazoaire de cette famille de gènes (Koontz et al., 2013). Les gènes de la sous-famille *Vgll4/Tgi*, au contraire de la sous-famille *Vgll1-3/Vg*, sont uniques dans toutes les espèces analysées.

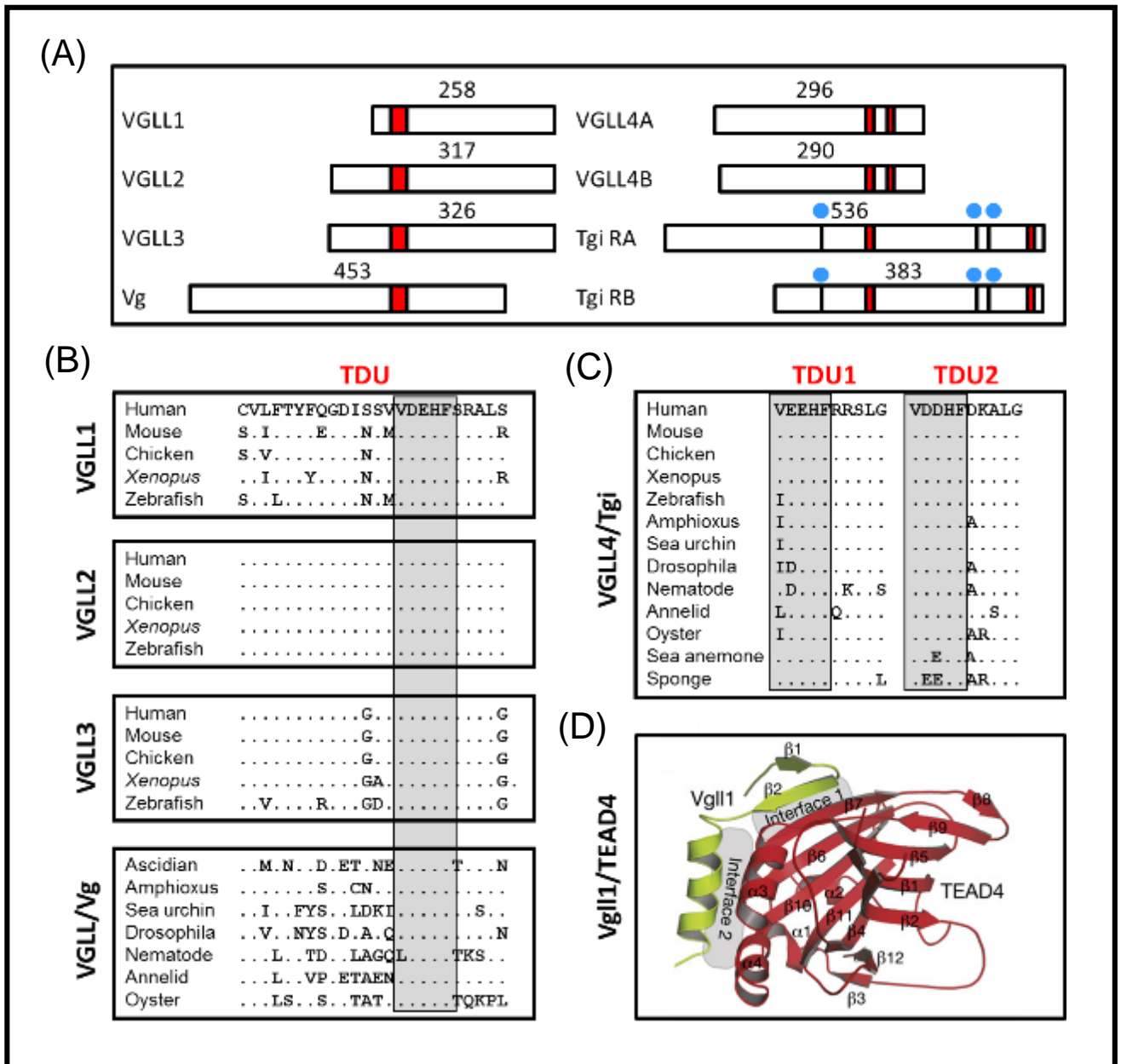


Figure 3 : Représentation schématique et alignement des différents membres de la famille vestigial.
(A) Représentation schématique des protéines humaines (Vgll1, Vgll2, Vgll3 et Vgll4) et de drosophile (Vg et Tgi). La taille des protéines, en acides aminés, est indiquée au-dessus et la position et la taille du domaine tordu (en rouge), les protéines, en acides aminés, est dessinées à l'échelle.
(B) Comparaison de séquence du domaine Tordu des membres de la sous famille Vgll1-3/Vg chez différentes espèces. La comparaison a été faite par rapport à la séquence humaine.
(C) Comparaison des domaines TDU1 et TDU2 des membres de la sous famille Vgll4/Tgi des différentes espèces. La séquence V-D/E-D/E-HF conservée est surlignée en gris. Les points indiquent des acides aminés identiques.
(D) Représentation en diagramme de Ribbon de la structure Vgll1/TEAD4. L'interaction entre les deux protéines est divisée en deux interfaces. TEAD4 est coloré en rouge et Vgll1 en vert (Pobbati et al., 2012).

Ainsi, *Vgll4* ne semble pas avoir été sujet aux évènements de duplication ou, hypothèse moins probable, les gènes dupliqués ont été perdus. En comparaison, les gènes *TEAD* apparaissent avant les gènes *Vestigial-like* au cours de l'évolution et sont présents chez la levure et l'amibe unicellulaire *Acanthamoeba castellanii* (Sebe-Pedros et al., 2012) (Figure 2).

3. Le domaine Tondu comme unité de base fonctionnelle de l'évolution des protéines Vestigial

Le domaine Tondu permet l'interaction avec les protéines TEAD et constitue une signature des protéines Vestigial-like. En dehors de ce domaine, les protéines présentent peu ou pas de similarité. Dans la sous-famille Vgll1-3/Vg, l'unique domaine Tondu est composé de 24 acides aminés et il est situé à l'extrémité N-terminale des protéines VGLL1-3 alors qu'il est central dans la protéine Vg de drosophile (Figure 3A). En termes de conservation de séquence entre espèces de vertébrés, le domaine Tondu de VGLL2 est totalement conservé alors qu'il est le plus divergent pour VGLL1 et présente une situation intermédiaire pour VGLL3 (Figure 3B). Chez les invertébrés, la conservation du domaine Tondu est moindre entre les espèces mais il présente néanmoins 50% d'identité avec le domaine présent dans les protéines de vertébrés (Figure 3B).

Les deux domaines Tondu (TDU1 et TDU2) présents dans la sous-famille Vgll4/Tgi ont une taille de 10 acides aminés et sont très conservés de l'éponge aux mammifères (Figure 3C). Une caractéristique remarquable est que les deux domaines sont très similaires à la séquence des 10 derniers acides aminés du domaine Tondu de la sous-famille VGLL1-3/Vg. De plus, la séquence VD/ED/EHF (VxxHF) qui a été identifiée comme cruciale pour l'interaction avec les protéines TEAD est très conservée entre toutes les protéines VGLL (encadrés grisés Figure 3B et 3C) (Pobbati et al., 2012). Puisque les domaines TDU1 et TDU2 sont apparus très tôt au cours de l'évolution, avant l'émergence du domaine TDU unique présent chez les bilatériens, ils peuvent être considérés comme le domaine Tondu ancestral et constituent ainsi l'unité de base de l'évolution des protéines VGLL.

L'unité de base de 10 acides aminés, présente en deux copies dans la protéine Vgll ancestrale, a été soumise à la pression de sélection pour conférer la capacité d'interagir avec TEAD. Le domaine TDU de 24 acides aminés présent dans la sous-famille de protéines VGLL1-3/Vg est apparu pendant la transition à l'origine des bilatériens. Il est à noter que le motif VxxHF est totalement conservé entre le domaine TDU2 et le domaine TDU alors que le domaine TDU1 présente des divergences où 50% des protéines avec ce domaine ont une isoleucine ou une leucine au lieu d'une valine (Figure 3C).

Il est possible d'émettre l'hypothèse que le domaine TDU2 a subi un événement de duplication qui a contribué à la formation du domaine TDU en recrutant une région contigüe de 14 acides aminés.

L'interaction entre les domaines Tondu et les protéines TEAD a été démontrée pour la protéine Vg de drosophile et la protéine VGLL1 humaine et les analyses par mutagenèse ont montré que les portions N-terminale et C-terminale de TDU sont impliquées dans la liaison de Vestigial à TEAD (Simmonds et al., 1998; Vaudin et al., 1999). La protéine TEAD1 humaine est une protéine de 426 acides aminés, dont la région 205-329 impliquée dans l'interaction avec la protéine VGLL1 est très conservée avec la région correspondante de la protéine Sd de drosophile (Vaudin et al., 1999). Plus récemment, la structure du complexe Vgll1/TEAD a été déterminée et l'interaction entre les protéines se fait par une région interface de la protéine Vgll1 où le motif ⁴¹VxxHF⁴⁵ est crucial (Pobbati et al., 2012) (Figure 3D). Les deux motifs VxxHF présents dans les domaines TDU1 et TDU2 des protéines Tgi de drosophile et VGLL4 humaine doivent être mutés pour abolir l'interaction avec TEAD, soulignant son importance fonctionnelle (Guo et al., 2013; Koontz et al., 2013). Étonnement, une interface similaire intervient dans l'interaction protéique entre les protéines TEAD et YAP1, suggérant une compétition entre les protéines Vestigial-like et YAP1 pour la formation du complexe avec TEAD (Pobbati et al., 2012).

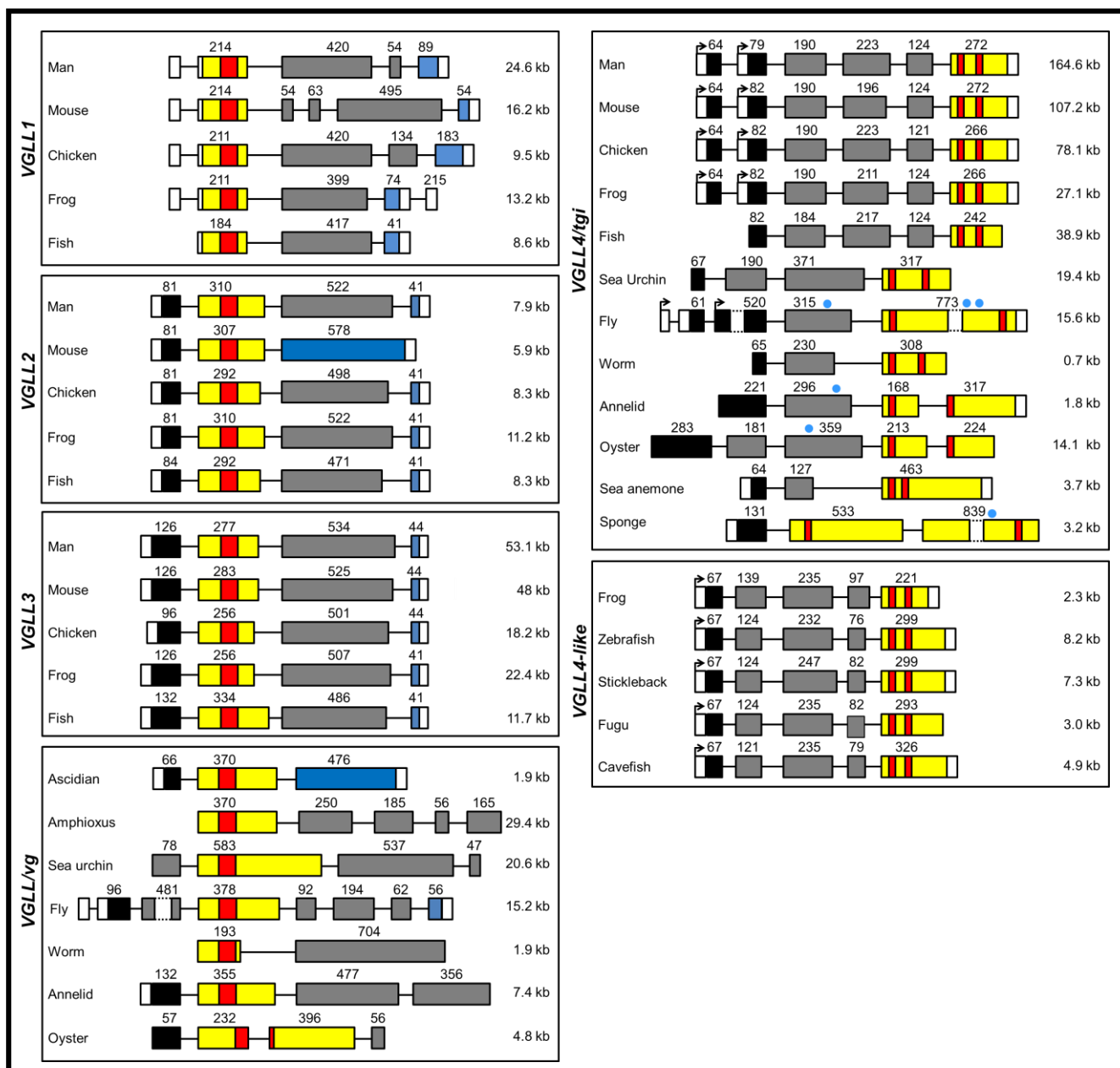


Figure 4 : Structure des gènes de la famille Vestigial-like dans différentes espèces.

Les exons et les introns sont représentés par des boîtes et des lignes respectivement. Les séquences codantes sont figurées par des boîtes colorées et les régions non codantes sont représentées par des boîtes blanches. La taille des régions codantes, en nucléotides est indiquée au-dessus de chaque exon. Les introns et les régions non codantes ne sont pas représentés à l'échelle. La taille du gène est indiquée sur la droite. Les domaines Tondu sont en rouge et les exons contenant ce domaine sont en jaune. Les exons contenant le site d'initiation de la traduction sont en noir avec la région 5' non traduite en blanc. Pour VGLL1-3 et vg, les exons contenant la région 3' non traduite sont en bleu. Les motifs PPXY de tgi dans la mouche, l'huître ou l'éponge sont indiqués par des points bleus. (D'après Simon et al., 2015).

Gene	VGLL1	VGLL2	VGLL3	VGLL4
Human (1-4)	Placenta	Sk. muscle	Placenta	Heart, kidney, brain, placenta, lung, intestine, spleen, Sk. muscle, liver
Mouse (2-4)		<i>Pharyngeal arches, somites, hypothalamus</i> Sk. muscle	<i>Somites, midbrain</i> Sk. muscle, brain, kidney	
Chicken (5)	Head*	<i>Somites, head muscle, limb muscle</i>		Bursa of Fabricius*, epiphyseal*, limb*, intestine*, brain*
Xenopus (6,7)	<i>Epidermis</i> Skin	<i>Somites, head muscles, hypaxial muscle</i> Sk. muscle, brain	<i>Hindbrain</i> Stomach, heart, brain	<i>Brain, eyes, branchial arches, somites</i> Ovary*, stomach*, brain*, heart*, liver*, skin*, kidney*, testis*
Zebrafish (8)		<i>Somites</i>		

Tableau 2 : Comparaison du profil d'expression des gènes *vestigial-like* chez les vertébrés.

L'expression des différents gènes dans les tissus adultes ou l'embryon (en italique) est compilée à partir des études suivantes (1) (Maeda et al., 2002), (2) (Chen et al., 2004b), (3) (Mielcarek et al., 2002), (4) (Mielcarek et al., 2009), (5) (Bonnet et al., 2010), (6) (Faucheux et al., 2010), (7) (Barrionuevo et al., 2014), (8) (Mann et al., 2007). * Les données ont été obtenues à partir des profils EST de différentes sources : VGLL1 de poulet (BB-GG19426), VGLL4 (BB-GG19430) ; l'expression embryonnaire est notée en italique. Sk. (skeletal, squelettique). (D'après Simon et al., 2015).

C. Structure, expression et fonction des gènes de la sous-famille contenant un domaine Tondu

Les caractéristiques structurales et fonctionnelles des gènes seront présentées successivement pour les différents membres de la sous-famille contenant un domaine Tondu unique. En termes de structure des gènes, il n'y a aucune donnée publiée actuellement. Aussi, il a été entrepris d'établir les structures comparées des gènes dans différentes espèces (Figure 4) (Simon et al., 2015).

Dans ce but, les régions génomiques contenant des séquences codant un domaine Tondu ont été identifiées dans plusieurs espèces. Les données obtenues indiquent qu'au niveau génomique, les gènes *Vestigial-like* présentent quelques hétérogénéités structurales mais aussi des caractéristiques communes qui ont été conservées au cours de l'évolution (Figure 4). L'expression des gènes *Vestigial* est encore très parcellaire et n'a été étudiée que pour quelques espèces (homme, souris, xénope, poulet et poisson-zèbre).

Le travail le plus exhaustif sur l'expression des différents gènes de la famille au cours du développement embryonnaire et chez l'adulte a été réalisé dans le modèle xénope (Tableau 2) (Fauchaux et al., 2010).

De nombreux résultats sur la fonction de *Vestigial* chez la drosophile ont été rapportés alors que les fonctions des gènes orthologues chez les vertébrés sont encore mal connues. De fait, il n'y a pas de modèles de souris knock-out ni de données obtenues par des stratégies perte de fonction. Cependant, des fonctions potentielles des gènes *VESTIGIAL-LIKE* chez l'homme, en particulier dans le cancer, ont été proposées à partir d'études cliniques.

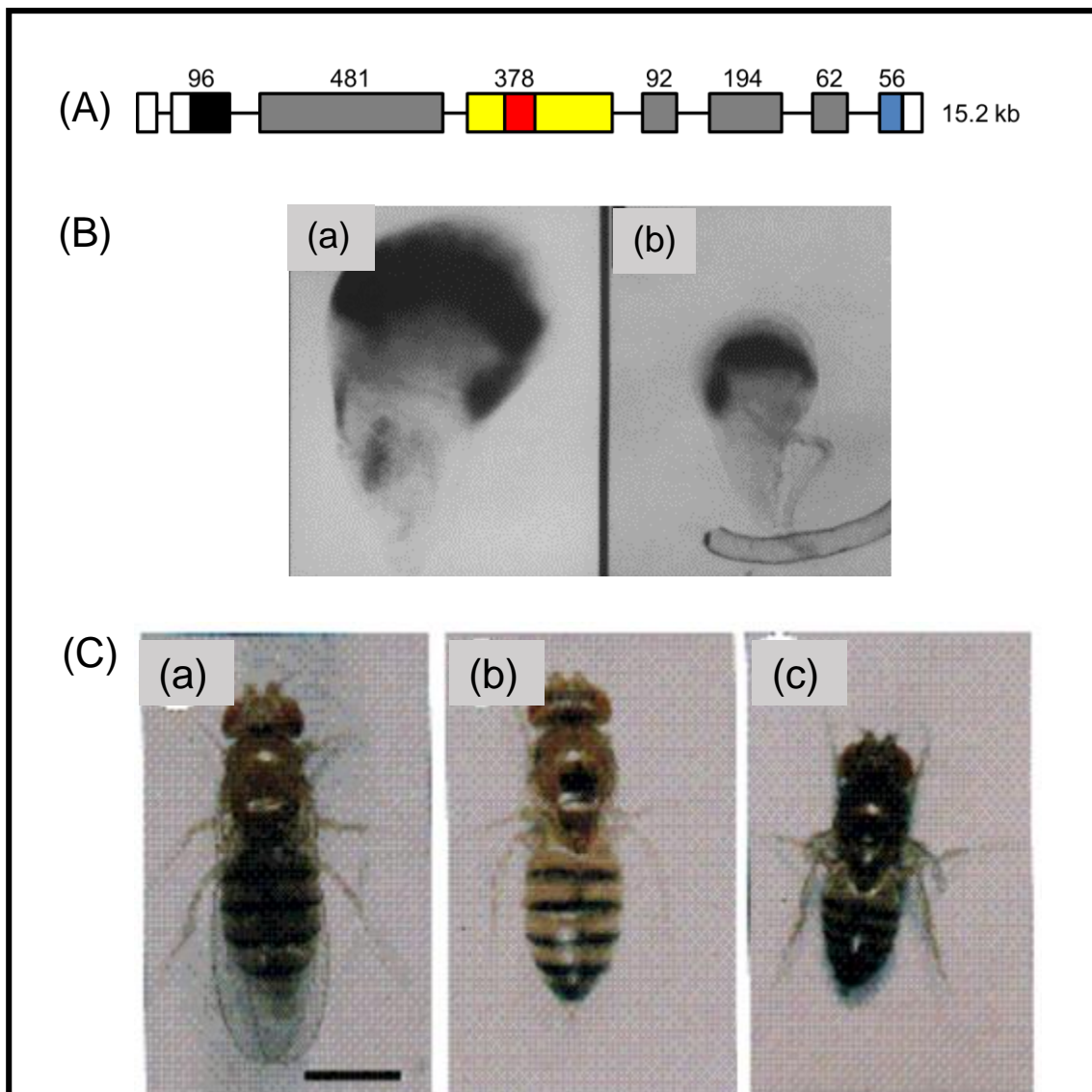


Figure 5 : Structure et expression du gène *Vestigial* chez la drosophile.

(A) Diagramme schématique représentant la structure du gène *vestigial* de drosophile. La taille des régions codantes est indiquée en nucléotides au-dessus de chaque exon. La taille du gène est indiquée sur la droite. Le domaine tondu (rouge) est situé dans l'exon 4 (jaune).

(B) Expression de *vg* dans les disques imaginaux de l'aile (a) et de l'haltere (b) (Williams et al., 1991).

(C) Mutants de drosophile. La mutation du gène *vestigial* entraîne une malformation des ailes et des haltères (b) par rapport à la drosophile sauvage (a). La mutation du gène *scalloped* entraîne le même phénotype que la mutation du gène *vg* chez la drosophile avec une malformation des ailes (c) (Williams et al., 1993).

1. Le gène *vestigial* de drosophile

Le clonage du gène *vg* de drosophile a été réalisé par une stratégie utilisant l'élément transposable P, identifiant ainsi une région de 19 kb et un transcrit de 3,8kb (Williams et al., 1990; Williams and Bell, 1988). Le gène *vg* présente la structure la plus complexe des gènes *vestigial*. Il possède 8 exons et la séquence nucléotidique codant le domaine Tondu est située dans le quatrième exon. La protéine a 453 acides aminés et ne présente aucun motif de liaison à l'ADN (Figure 5A). Elle est cependant localisée dans le noyau des cellules destinées à former les structures des ailes (Williams and Bell, 1988; Williams et al., 1991).

Vg est tout d'abord exprimé pendant l'embryogenèse dans un petit groupe de cellules qui définira l'ébauche de l'aile. Son expression est ensuite restreinte spatialement pendant les stades larvaires à l'ébauche de l'aile, aux disques imaginaux des haltères et au système nerveux central (Figure 5B) (Williams et al., 1991; Zider et al., 1996). L'expression de *vg* est régulée par un élément intronique qui est conservé entre les espèces *Drosophila melanogaster* et *Drosophila virilis* (Williams et al., 1991). L'expression spécifique de *vg* dans l'aile dépend de deux enhancers (vg^{BE} et vg^{QE}) activés séquentiellement pendant le développement et qui sont sous le contrôle des systèmes de signalisation dorsoventrale et antéropostérieure (Kim et al., 1996; Klein and Arias, 1999; Williams et al., 1994). L'expression globale de *vg* représente la somme des signaux des voies Notch, wingless et dpp qui sont intégrés dans des modules *cis*-régulateurs distincts du gène (Carroll et al., 2001).

Le mutant *vestigial* (Vg) est l'un des plus étudiés chez la drosophile et un nombre important d'allèles a été isolé et décrit. En absence d'un gène sauvage fonctionnel, une importante mort cellulaire a lieu dans le disque imaginal de l'aile ayant pour conséquence une perte complète des structures bordant l'aile (Figure 5C) (Fristrom, 1969). De plus, des mouches mutantes homozygotes pour Vg ont une durée de vie plus courte, une stérilité chez la femelle et une dégénérescence des muscles thoraciques (Bernard et al., 2009). Vg a été caractérisée comme une protéine sélecteur indispensable à la formation de l'aile ayant la capacité de reprogrammer des cellules de la patte ou d'autres disques imaginaux pour adopter un destin de l'aile (Kim et al., 1996; Mann and Carroll, 2002; Williams et al., 1991).

Plusieurs éléments ont suggéré que Vg pouvait agir avec un partenaire qui a été identifié comme étant *Scalloped* (Sd). En effet, les gènes *vg* et *sd* sont tous deux nécessaires au développement de l'aile et ils présentent des profils d'expression comparables et des phénotypes mutants similaires (Figure 5C) (Campbell et al., 1992; Campbell et al., 1991; Williams et al., 1993). Des études indépendantes ont établi la nécessité d'une interaction entre les protéines Vg et Sd pour le développement de l'aile et la régulation des gènes spécifiques de l'aile (Halder et al., 1998; Paumard-Rigal et al., 1998; Simmonds et al., 1998). Le domaine d'interaction entre les deux protéines a été cartographié comme une région de 56 acides aminés dans la protéine Vg et dans la région carboxy-terminale de la protéine Sd (Simmonds et al., 1998).

Sd fait partie d'une famille de facteurs de transcription très conservée ayant en commun un domaine de liaison à l'ADN ou domaine TEA. La protéine humaine TEAD1 est l'orthologue de la protéine de drosophile Sd et peut se lier à la protéine de drosophile Vg avec la même affinité (Campbell et al., 1992; Jacquemin and Davidson, 1997; Simmonds et al., 1998). Des études génétiques et biochimiques soutiennent un modèle dans lequel les protéines Vg et Sd forment un hétérodimère qui se lie à l'ADN *via* le domaine TEA de Sd (Halder et al., 1998). Ce complexe est requis pour la prolifération cellulaire et la survie cellulaire dans le disque imaginal de l'aile (Delanoue et al., 2004).

L'expression de *vg* n'est pas restreinte aux régions présomptives des disques imaginaires des ailes et des haltères mais est elle aussi trouvée dans un sous-groupe de myoblastes présents dans l'épithélium des disques des ailes et qui formeront un sous-ensemble de muscles thoraciques (Bernard et al., 2009; Bernard et al., 2003; Deng et al., 2009; Sudarsan et al., 2001). Ainsi, la protéine Vg régule le développement et la différenciation musculaire chez la drosophile et plus particulièrement des muscles indirects du vol. Cette propriété nécessite une interaction entre la protéine Vg et le facteur myogénique Dmef2 ainsi que l'inhibition de la voie Notch (Bernard et al., 2009; Bernard et al., 2003; Deng et al., 2009; Sudarsan et al., 2001). L'interaction entre les protéines Vg et Dmef2 semble être une propriété conservée au cours de l'évolution car la protéine humaine VGLL2 est capable d'interagir avec le facteur de transcription MEF2 pour activer des promoteurs dépendants de MEF2 et stimuler la différenciation musculaire induite par le facteur myogénique MyoD (Maeda et al., 2002a).

L'activité du complexe protéique Sd-Vg dépend de sa localisation subcellulaire. En effet, la protéine Vg est majoritairement cytoplasmique mais devient nucléaire en présence de son partenaire protéique Sd (Goulev et al., 2008; Halder et al., 1998; Simmonds et al., 1998; Wu et al., 2008; Zhang et al., 2008). Cet effet dépend du signal de localisation nucléaire présent dans la protéine Sd (Magico and Bell, 2011; Srivastava et al., 2002). La voie de signalisation Hippo peut entraîner la localisation cytoplasmique de la protéine Sd et du complexe Sd-Vg affectant ainsi son activité transcriptionnelle et ceci indépendamment de la protéine Yorkie (ou Yki) (Cagliero et al., 2013).

In vitro, la protéine Vg de drosophile peut changer la sélectivité des cibles de son partenaire Sd (Halder and Carroll, 2001). Plusieurs expériences *in vivo* corroborent ces conclusions. L'expression de Vg dans le disque imaginal de l'aile est sous le contrôle de la voie de signalisation Notch. Dans la région centrale de l'aile où Notch est actif, celui-ci empêche l'expression des gènes cibles du complexe protéique Sd-Yki en induisant un fort niveau d'expression de la protéine Vg favorisant la formation du complexe Sd-Vg qui active des gènes cibles différents (Djiane et al., 2014). Le ratio entre les protéines Sd, Yki et Vg est donc important pour déterminer si Sd forme un complexe avec Yki ou avec Vg, permettant ainsi une activation différentielle de gènes cibles. La même situation existe probablement chez les mammifères où le complexe protéique TEAD4-VGLL1 active des gènes cibles autres que ceux activés par le complexe TEAD4-YAP1 et réciproquement (Pobbati et al., 2012). Il existe une compétition entre VGLL1 et YAP1 (ou entre Vg et Yki) pour la liaison à TEAD (ou Sd), en faveur de VGLL1 (ou Vg). Ceci suggère que Sd se lie à Vg ou Yki de façon mutuellement exclusive excluant la formation d'un complexe trimérique entre Sd, Vg et Yki (Cagliero et al., 2013; Pobbati et al., 2012).

Espèces	1 domaine Tondou			2 domaines Tondou	
	VGLL1	VGLL2	VGLL3	VGLL4	VGLL4L
Homme	258	317	326	290/296	ND
Souris	307	322	325	281/287	ND
Poulet	ND	304	297	288/294	ND
Xénope	228	317	310	286/293	252
Poisson	187	296	330	276/282	266

Tableau 3 : Comparaison de la taille des protéines Vestigial-like de différentes espèces de vertébrés.

La taille des protéines est exprimée en acides aminés sont déduites des informations des banques de données. Les protéines de poisson correspondent à celle du poisson-zèbre. ND : Non Déterminé.

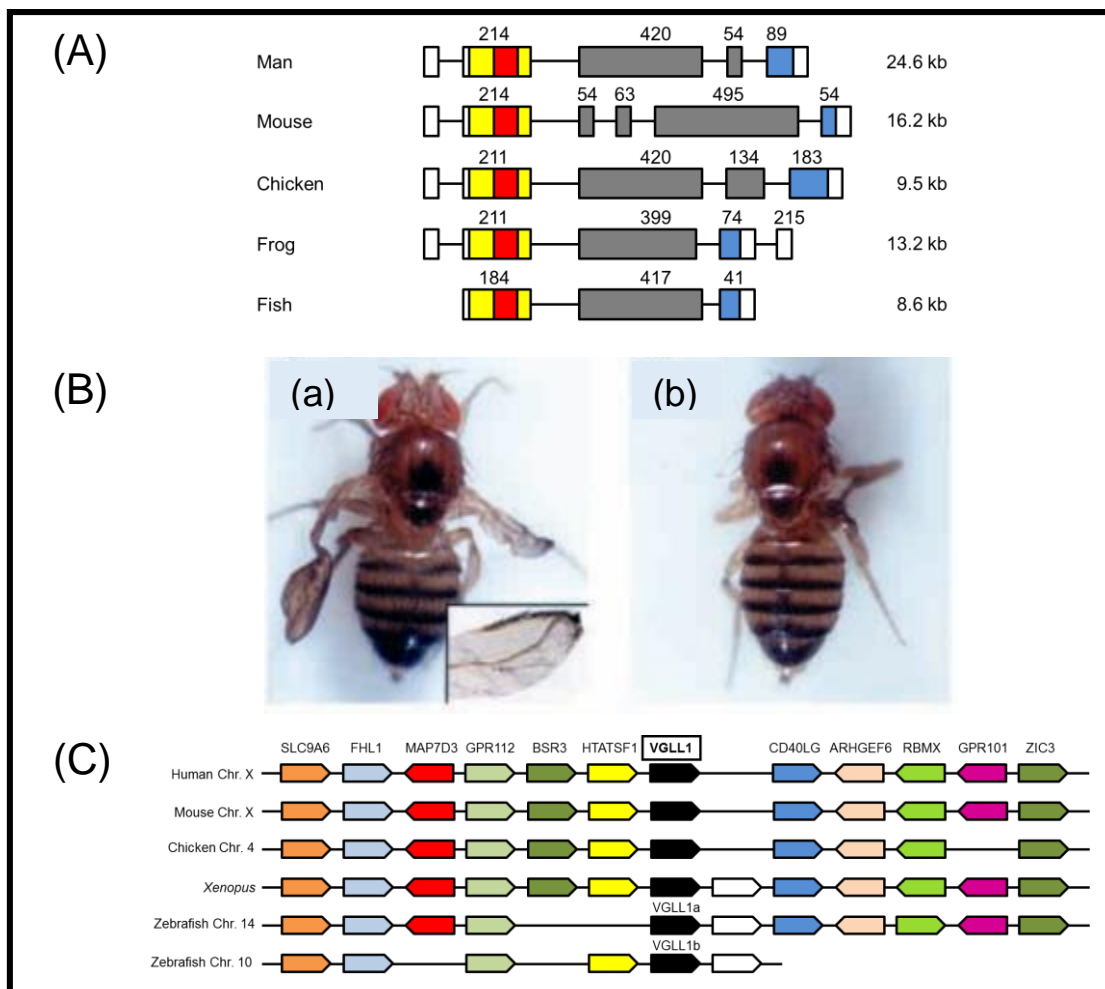


Figure 6 : Structure, synténie et expression de *Vestigial-like 1* dans les différentes espèces.

(A) Diagramme schématisant la structure génomique de *Vestigial-like 1* dans les espèces représentatives. La taille des régions codantes est indiquée en nucléotides au-dessus de chaque exon. La taille des gènes est indiquée sur la droite. Les domaines Tondou sont en rouge et les exons qui contiennent le domaine Tondou en jaune. Les exons contenant le site d'initiation de la traduction sont en noir avec la région 5' non traduite en blanc et la région 3' non traduite est en bleu.

(B) Sauvetage du phénotype *vg* par la protéine Tondou humaine (a) par rapport au mutant *vg* (b) (Vaudin et al., 1999).

(C) Régions synténiques conservées entre l'humain (Human), la souris (Mouse), le poulet (Chicken), le xénope (*Xenopus*) et le poisson zèbre (Zebrafish). Les gènes sont représentés comme des boîtes colorées avec la flèche qui indique l'orientation des unités de transcription. Les boîtes de mêmes couleurs correspondent aux gènes orthologues. Le dessin n'est pas à l'échelle pour éviter la complexité.

2. *Vestigial-like 1* (TONDU)

Le gène *Vestigial-like 1* (*VGLL1*) humain a été décrit pour la première fois lors de la recherche de protéines présentant une homologie avec la protéine Vestigial de drosophile (Vaudin et al., 1999). L'ADNc identifié code une protéine de 258 acides aminés (Tableau 3) dont l'homologie avec la protéine de drosophile est limitée à un domaine de 24 acides aminés (domaine tondu) qui est essentiel à la protéine pour son interaction avec la protéine Scalloped. La recherche dans les banques de données des gènes *VGLL1* de différentes espèces de vertébrés montre que le gène *Vgll1* présente une variation du nombre d'exons, allant de 3 chez le poisson-zèbre à 6 chez la souris. L'exon 1 est un exon leader dans toutes les espèces analysées sauf chez le poisson-zèbre par manque de données (Figure 6A, Simon et al., 2015). Le gène *Vgll1* de souris est distinct de son orthologue humain du fait de la présence d'un intron supplémentaire. La protéine *Vgll1* présente moins de 30% d'identité en dehors du domaine Tondu qui est codé dans toutes les espèces analysées par l'exon 2. La protéine *Vgll1* est un coactivateur transcriptionnel qui interagit *via* son domaine tondu avec le facteur de transcription TEAD ; elle est capable de sauver la perte de fonction de vestigial chez la drosophile (Figure 6B) (Vaudin et al., 1999).

L'analyse de la synténie montre une conservation remarquable entre les gènes *Vgll1* mammifères (souris et humain), aviaire (poulet), amphibien (xénope) et poisson (poisson-zèbre) (Figure 6C). En accord avec la duplication du génome qui a eu lieu dans le lignage téléostéen après la divergence d'avec les tétrapodes, il existe deux gènes homéologues *vgll1a* et *vgll1b* chez le poisson-zèbre (Figure 6C) (Taylor et al., 2003). Chez l'homme, *VGLL1* est exprimé dans les tissus fœtaux au niveau du poumon et du rein mais pas dans le cerveau ni dans le foie alors que son expression chez l'adulte est restreinte au placenta (Maeda et al., 2002a; Vaudin et al., 1999). Chez le xénope, *vgll1* est exprimé dans le futur épiderme de l'embryon et seulement dans la peau chez l'adulte (Faucheux et al., 2010) (Tableau 2). Bien que le rôle de *Vgll1* dans le développement et les maladies chez les mammifères ne soit pas connu, une étude récente a identifié un site de reconnaissance pour le miR-934 dans l'intron 4 du gène humain (Castilla et al., 2014).

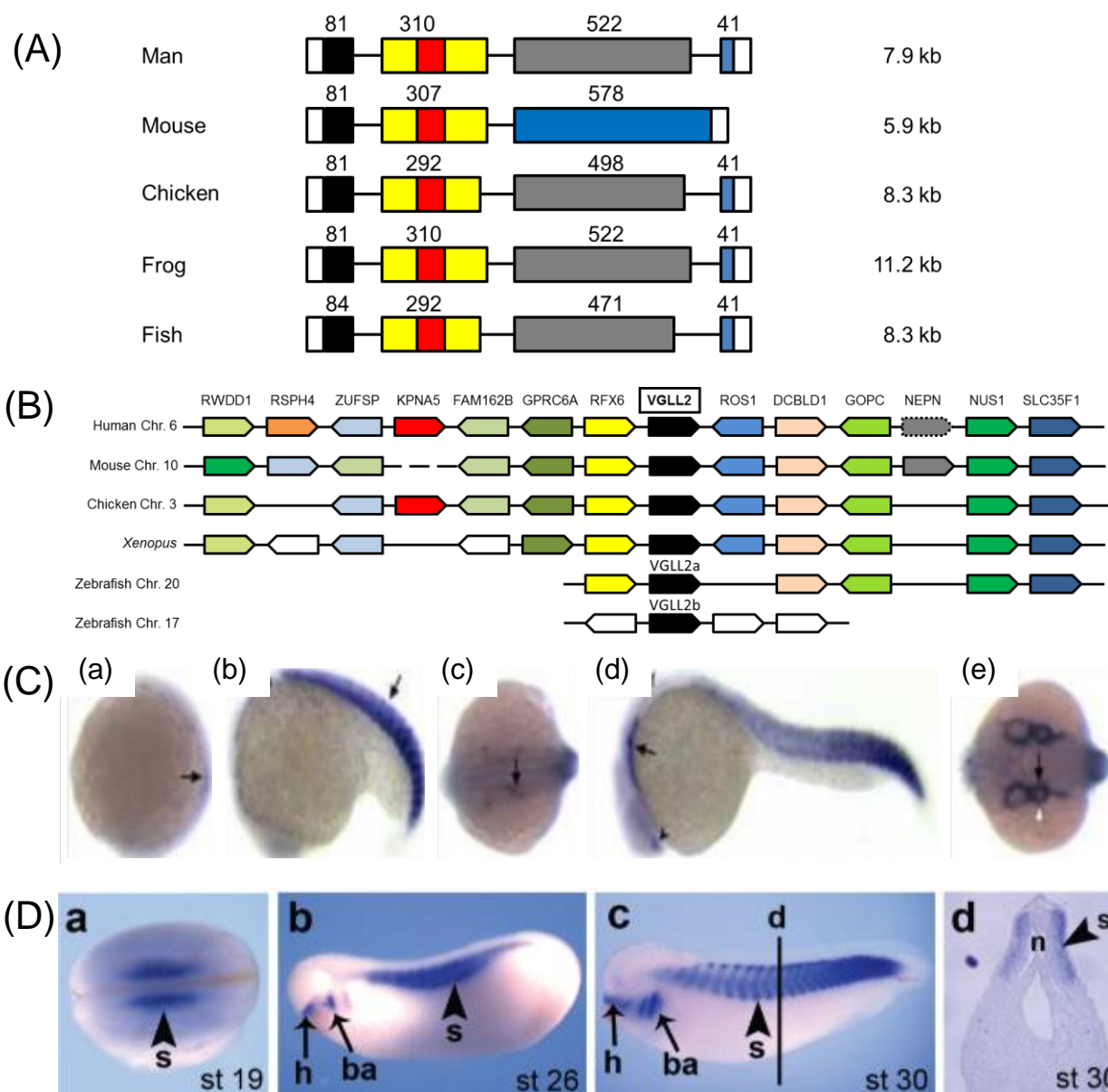


Figure 7 : Structure, synténie et expression de *Vestigial-like 2* dans les différentes espèces.

(A) Diagramme schématique représentant la structure des gènes. La taille des régions codantes est indiquée en nucléotides au-dessus de chaque exon. La taille des gènes est indiquée sur la droite. Les domaines Tondu sont en rouge et les exons qui contiennent le domaine Tondu en jaune. Les exons contenant le site d'initiation de la traduction sont en noir avec la région 5' non traduite en blanc et la région 3' non traduite est en bleu.

(B) Régions synténiques conservées entre l'humain (Human), la souris (Mouse), le poulet (Chicken), le xénope (*Xenopus*) et le poisson zèbre (Zebrafish). Les gènes sont représentés comme des boîtes colorées avec la flèche qui indique l'orientation des unités de transcription. Les boîtes de mêmes couleurs correspondent aux gènes orthologues.

(C) Expression du gène *Vgll2* dans des embryons de poisson-zèbre par hybridation *in situ* au stade 2 somites (a), 17 somites (b et c) ou 22 heures après fécondation (d et e) ; vue latérale (a, b et d) ; vue dorsale (c et e) (Johnson et al., 2011).

(D) Expression du gène *vestigial-like 2* dans des embryons de xénope par hybridation *in situ* au stade 19 (a), 26 (b) et 30 (c et d) ; vue dorsale (a) ou latérale (b et c), section transversale (d). s, somite ; h, hatching gland (glande d'adhésion) ; ba, arcs branchiaux ; n, notochorde.

La coexpression de *VGLL1* et miR-934 dans le carcinome du sein suggère un rôle potentiellement oncogénique de *VGLL1* (Castilla et al., 2014). Ces observations sont reliées au fait que *Vgll1* forme un complexe avec TEAD4 pouvant activer des gènes de prolifération et faciliter l'ancrage indépendant de la prolifération cellulaire (Pobbati et al., 2012). Toutefois, la démonstration d'une fonction de *VGLL1* dans le cancer chez l'homme reste à établir.

3. *Vestigial-like 2* (VITO-1)

Le gène *Vestigial-like 2* (*VGLL2*) humain a été identifié *in silico* lors de la recherche de gènes contenant des séquences codant des protéines homologues à la protéine de drosophile. Ces séquences ont permis ensuite d'amplifier un ADNc à partir de muscle squelettique humain (Maeda et al., 2002a). Par ailleurs, un ADNc codant *VGLL2* (nommé initialement VITO-1) a été isolé en utilisant une approche d'hybridation soustractive pour identifier des gènes exprimés dans le muscle squelettique humain (Mielcarek et al., 2002a). Les ADNc *VGLL2* ont été également caractérisés chez le poisson-zèbre, le poulet et le xénope (Bonnet et al., 2010; Fauchaux et al., 2010; Mann et al., 2007) (Hamade et al., 2013b) (Tableau 1). La protéine humaine *VGLL2* a 317 acides aminés et le domaine Tondu, codé par l'exon 2, est totalement identique entre toutes les protéines *VGLL2* de vertébrés qui ont 60% d'identité entre elles (Tableau 3). La recherche dans les banques de données des gènes *VGLL2* de différentes espèces de vertébrés montre que leur structure est très conservée avec 4 exons et un profil d'épissage exon/intron conservé (Figure 7A). Cependant, le gène murin ne partage pas ces caractéristiques et a perdu le troisième intron. L'analyse synténique des régions génomiques flanquantes *VGLL2* montre une grande conservation entre les espèces et, comme pour *Vgll1*, le gène *Vgll2* du poisson-zèbre a deux homéologues *Vgll2a* et *Vgll2b* situés sur des chromosomes différents (Figure 7B). Le gène *Vgll2* est principalement exprimé, chez tous les vertébrés étudiés, dans le myotome de l'embryon précoce et dans le muscle squelettique adulte (Tableau 2) (Figure 7C et 7D). Ceci est en accord avec la régulation positive de l'expression du gène observée lors de la différenciation musculaire des myoblastes C2C12 (Maeda et al., 2002a; Mielcarek et al., 2002a).

Dans l'embryon de poulet et de xénope, le gène *vgl2* est exprimé en aval des facteurs myogéniques (Bonnet et al., 2010; Faucheux et al., 2010). La protéine Vgl2 de mammifères n'a pas d'activité myogénique par elle-même mais elle peut stimuler la conversion myogénique induite par MyoD de cellules fibroblastiques et ceci *via* son interaction avec TEAD. Ces résultats indiquent un rôle crucial de la protéine comme cofacteur nécessaire à la différenciation musculaire squelettique (Chen et al., 2004a; Fristrom, 1969; Gunther et al., 2004; Maeda et al., 2002a). La protéine Vgl2 n'interagit pas uniquement avec le facteur de transcription TEAD mais aussi avec le facteur régulateur musculaire MEF2. Dans ce cas, elle peut activer en cellules en culture des promoteurs de gènes dépendants de MEF2 (Maeda et al., 2002). La fonction de Vgl2 pourrait être reliée à l'activation des gènes musculaires de type lent. En effet, l'expression de *Vgl2* est plus élevée dans les myofibres de type lent que dans celles de type rapide et elle n'est pas affectée dans les souris mutantes *six1/six4* où le programme du muscle de type rapide est perturbé (Niro et al., 2010). De façon remarquable, la fonction de Vgl2 dans le programme de différenciation musculaire semble être une caractéristique conservée au cours de l'évolution. En effet, chez la drosophile, la protéine Vg forme un complexe à trois partenaires avec les protéines Sd et Dmef2 pour activer le programme de différenciation des muscles indirects du vol (Caine et al., 2014; Deng et al., 2010). Dans ce cas, la protéine interagit avec la protéine Dmef2 *via* une région différente de celle avec la protéine Sd (Deng et al., 2009). Outre son expression dans le muscle, le gène *Vgl2* est également exprimé dans les arcs pharyngiens de l'embryon de vertébré et dans le cerveau antérieur au niveau du futur hypothalamus (Bonnet et al., 2010; Faucheux et al., 2010; Johnson et al., 2011; Kurrasch et al., 2007).

Chez le poisson-zèbre, l'analyse knock-down, basée sur la stratégie antisens à l'aide, de morpholinos, a montré que la protéine Vgl2 était nécessaire à l'intégrité de l'endoderme pharyngien et impliquée dans la formation du squelette craniofacial qui dérive des cellules de la crête neurale (Johnson et al., 2011). Chez l'homme, la délétion d'une partie du chromosome 6 contenant le gène *VGLL2* est corrélée à une dysmorphie de la face (Rosenfeld et al., 2012). Ces caractéristiques phénotypiques pourraient être liées à l'altération de l'expression du gène dans l'arc pharyngé et l'hypothalamus.

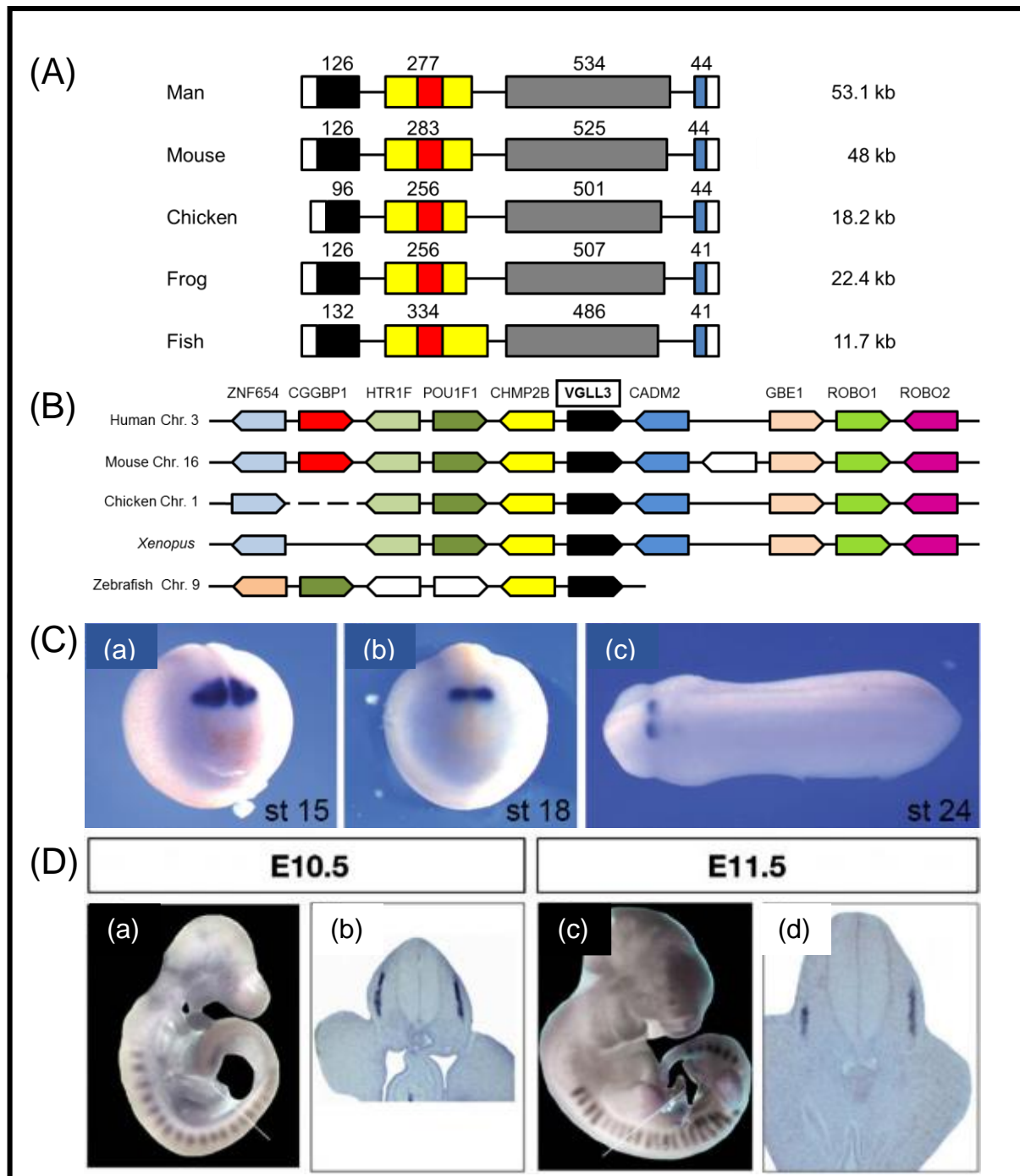


Figure 8 : Structure, synténie et expression de *Vestigial-like 3* dans les différentes espèces.

(A) Schéma représentant la structure du gène dans différentes espèces. La taille des régions codantes est indiquée en nucléotides au-dessus de chaque exon. La taille des gènes est indiquée sur la droite. La séquence codant le domaine Tonic est en rouge et les exons correspondants en jaune. Les exons contenant le site d'initiation de la traduction sont en noir. Les régions 5' et 3' non traduites sont en blanc et le dernier exon est en bleu.

(B) Régions synténiques conservées entre les gènes humain (Human), souris (Mouse), poulet (Chicken), xénope (*Xenopus*) et poisson-zèbre (Zebrafish). Les gènes sont représentés par des boîtes colorées avec la flèche indiquant l'orientation des unités de transcription. Les boîtes de mêmes couleurs correspondent aux gènes orthologues.

(C) Expression du gène *vgl3* par HIS dans des embryons de xénope de stade 15 (a), 18 (b) et 24 (c) ; vue frontale (a et b) ou dorsale (c) (Fauchoux et al., 2010).

(D) Expression du gène *vgl3* par HIS dans des embryons de souris de stade E10.5 (E et F) et 11.5 (G et H) ; (E et G) embryons entiers, (F et H) coupe transversale (Mielcarek et al., 2009).

4. *Vestigial-like 3* (VITO-2)

Le gène *Vestigial-like 3* (*VGLL3*) humain a été identifié initialement sur le chromosome 3 comme une séquence partielle codante pour le domaine tondu d'interaction avec TEAD (Maeda et al., 2002). Par ailleurs, un criblage *in silico* des banques de données avec la séquence codante du domaine Tondu a permis de caractériser l'ADNc *Vgll3* de souris, nommé initialement VITO-2, du fait d'une identité de 96% avec VITO-1 (*Vgll2*) au niveau du domaine tondu (Mielcarek et al., 2009). Un ADNc codant la protéine *Vgll3* a été cloné et caractérisé chez le xénope (Fauchaux et al., 2010).

La recherche dans les banques de données des gènes *VGLL3* de différentes espèces de vertébrés montre que la synténie des gènes *VGLL3* est très conservée entre les espèces (Figure 8A ; Simon et al., 2015). La taille du gène varie de 11,7 kb chez le poisson-zèbre à 53,1 kb chez l'homme (Figure 8A). De plus, les gènes *VGLL3* présentent la structure la plus conservée entre espèces par rapport aux autres gènes *Vestigial-like*. Le gène est constitué de 4 exons et présente un épissage totalement conservé, bien que la taille des exons diffère légèrement entre les espèces (Figure 8A). Ces différences dans la taille des exons donnent des protéines allant de 310 acides aminés chez le xénope à 330 acides aminés chez le poisson-zèbre (Tableau 3). Une particularité des protéines *VGLL3* de vertébrés est la présence au sein de la séquence protéique d'une répétition de 6 résidus histidine. Cette caractéristique est relativement peu commune et trouvée uniquement dans 86 protéines humaines (Salichs et al., 2009). La plupart des protéines présentant ces régions histidine sont exprimées comme *Vgll3* dans le cerveau adulte et/ou le système nerveux embryonnaire.

Dans l'embryon de xénope, *vgll3* a un profil d'expression unique, qui en fait un marqueur spécifique du rhombomère 2 du cerveau postérieur (Figure 8C) (Fauchaux et al., 2010). Dans l'embryon de souris de stade E8.5, *Vgll3* est exprimé de façon transitoire dans le neuroépithélium à la position du futur cerveau postérieur. Son

expression est ensuite détectée au stade E9.5 dans les somites (Figure 8D) puis au stade E13.5 dans les ganglions de la racine dorsale (Mielcarek et al., 2009). Le gène est aussi exprimé dans le cerveau postérieur des embryons de poulet (S. Duprez, communication personnelle). En raison de son expression restreinte au rhombomère 2, *vgll3* constitue un bon gène marqueur pour l'analyse du réseau génique qui contrôle et régule l'identité de cette portion du cerveau postérieur. Chez la souris, le gène *Vgll3* est un marqueur du lignage myogénique et a été identifié comme cible du facteur myogénique Pax3, suggérant qu'il pourrait être impliqué en aval de Pax3 dans le programme du développement musculaire (Lagha et al., 2010). Chez l'homme *VGLL3* est principalement exprimé dans le placenta alors que chez la souris et le xénope, il est plus largement exprimé dans le cerveau, le rein, l'estomac et le cœur (Tableau 2) (Faucheux et al., 2010; Maeda et al., 2002a; Mielcarek et al., 2009).

Une étude récente utilisant un système de différenciation cellulaire *in vitro* a souligné le rôle de la protéine Vgll3 comme régulateur négatif du programme de différenciation adipocytaire (Halperin et al., 2013). L'expression de *Vgll3* est régulée négativement pendant l'adipogenèse et sa surexpression inhibe la différenciation alors que sa perte de fonction la favorise.

Par ailleurs, plusieurs études ont suggéré le rôle potentiel de Vgll3 dans la régulation de la tumorigenèse. Ceci est relié au fait que le transfert d'un fragment du chromosome 3 humain, contenant entre autres le gène *VGLL3*, peut supprimer la tumorigénicité d'une lignée cellulaire de cancer ovarien (Cody et al., 2007). Dans ces expériences, l'expression du gène est accrue dans les cellules transformées et réduite dans les tumeurs malignes ovariennes suggérant une fonction suppresseur de tumeur (Cody et al., 2009; Gambaro et al., 2013). Plus récemment, *VGLL3* a été identifié comme une signature permettant de catégoriser la survie des patients atteints du cancer de la prostate (Peng et al., 2014). Cependant, des conclusions opposées indiquent que la surexpression de *VGLL3* dans les sarcomes des tissus mous est corrélée à l'amplification du gène (Antonescu et al., 2011; Hallor et al., 2009; Helias-Rodzewicz et al., 2010). Dans ces sarcomes, les gènes *YAP1* et *VGLL3*, qui codent tous deux des co-facteurs de TEAD1, sont amplifiés et l'inhibition de leur expression dans les cellules malignes a un effet anti-oncogénique (Helias-Rodzewicz et al., 2010). Une autre étude indique que le gène *VGLL3* est surexprimé dans le cartilage de patients atteint d'arthrose endémique (Wang et al., 2009).

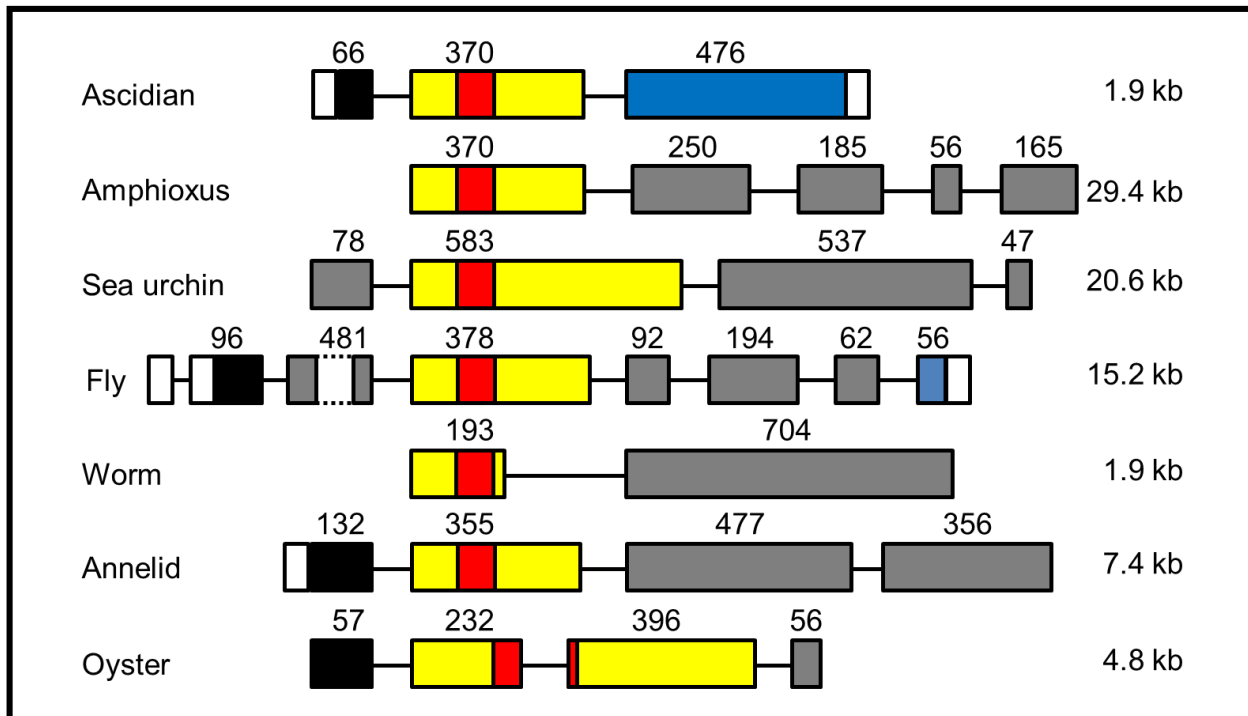


Figure 9 : Représentation schématique de la structure des gènes *vestigial-like* des invertébrés. La taille des régions codantes est indiquée en nucléotides au-dessus de chaque exon. La taille des gènes est indiquée sur la droite. Les domaines Tondu sont en rouge et les exons qui contiennent le domaine Tondu en jaune. Les exons contenant le site d'initiation de la traduction sont en noir avec la région 5' non traduite en blanc et la région 3' non traduite est en bleu.

Espèce	1 domaine Tondu	2 domaines Tondu
Ascidie	304	ND
Amphioxus	341	ND
Oursin	402	315
Drosophile	453	382/505
Nématode	285	201
Annélide	439	283
Huître	246	419
Anémone de mer	ND	218
Eponge	ND	500

Tableau 4 : Comparaison de la taille des protéines Vestigial-like de différentes espèces d'invertébrés.

La taille des protéines est exprimée en acides aminés. La taille a été estimée d'après les informations des banques de données. La protéine de nématode correspond à celle de *Trichinella spiralis* et celle d'annélide à celle de *Capitella teleta*. ND, Non Déterminé.

Récemment, il a été rapporté le cas d'un patient ayant des problèmes de croissance et dont le génome présente une microdélétion de la région du chromosome 3 contenant le gène *VGLL3* (Gat-Yablonski et al., 2011)

5. Les gènes *Vestigial-like* chez les invertébrés

A ce jour, les seules données de la littérature sur les gènes *Vestigial-like* chez les invertébrés concernent le gène de drosophile (voir § 1). La recherche dans les banques de données de gènes possédant un seul domaine Tondu dans différentes espèces d'invertébrés a permis d'identifier ce gène dans six espèces distinctes. Le gène n'a pas été identifié dans les espèces ancestrales comme l'anémone, l'éponge, les protistes, la levure et l'amibe (Tableau 4, Simon et al., 2015). Les gènes codant des protéines avec un seul domaine Tondu présentent, chez les invertébrés, une plus grande hétérogénéité structurale comparée aux vertébrés avec un nombre d'exons qui varie de 2 chez le ver, 3 chez l'ascidie, 4 chez l'oursin, l'annélide et l'huître, 5 chez l'amphioxus à 8 chez la drosophile. La taille des gènes varie de 1,9 kb chez l'ascidie à 15,2 kb pour la drosophile et plus de 20 kb chez l'oursin et l'amphioxus (Figure 9). Pour toutes les espèces analysées, le domaine Tondu est codé par un seul exon, sauf pour le gène chez l'huître où il est codé par deux exons successifs (Figure 9).

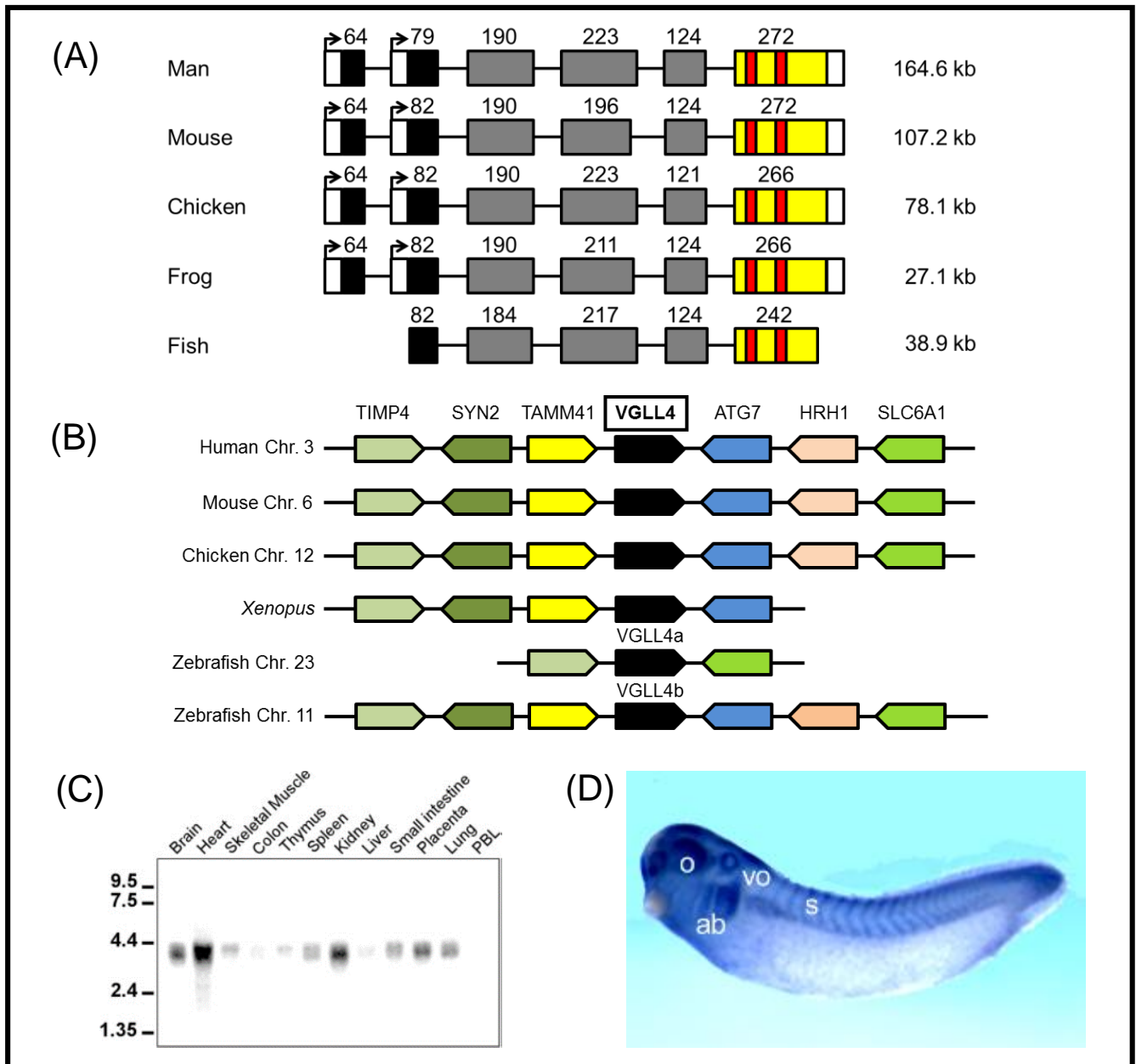


Figure 10 : Structure, synténie et expression de *Vestigial-like 4* dans différentes espèces.

(A) Schéma représentant la structure des gènes. La taille des régions codantes est indiquée en nucléotides au-dessus de chaque exon. La taille des gènes est indiquée sur la droite. Les séquences codant le domaine Tordu sont en rouge et les exons correspondants en jaune. Les régions contenant le site d'initiation de la traduction sont en noir. Les régions 5' et 3' non traduites sont en blanc.

(B) Régions synténiques conservées entre les gènes humain (Human), souris (Mouse), poulet (Chicken), xénope (Xenopus) et poisson-zèbre (Zebrafish). Les gènes sont représentés par des boîtes colorées avec la flèche indiquant l'orientation des unités de transcription. Les boîtes de mêmes couleurs correspondent aux gènes orthologues.

(C) Expression des gènes *VGLL4* humain par Northern Blot. Le gène est exprimé dans presque tous les tissus mais plus fortement dans le cœur, le rein et le cerveau (Chen et al., 2004).

(D) Expression du gène *vgll4* de xénope par hybridation *in situ* dans des embryons de xénope de stade 33. Le gène est exprimé dans l'œil (o), les somites (s), les arcs branchiaux (ab) et la vésicule otique (vo) (Fauchoux et al., 2010).

D. Structure, expression et fonction des gènes de la sous-famille contenant deux domaines Tondu

1. Les gènes *vestigial-like 4* chez les vertébrés

La séquence protéique VGLL4 humaine a été identifiée *in silico* dans les banques de données comme une protéine contenant deux domaines Tondu (TDU1 et TDU2). Elle a permis d'obtenir ensuite les ADNc humain et souris correspondants chez Open Biosystems (Chen et al., 2004b). L'ADNc codant la protéine *vgll4* de xénope a été caractérisé par la suite (Faucheux et al., 2010). La taille des gènes de vertébrés varie de 27,1 kb pour le gène amphibien à plus de 164,6 kb pour le gène humain (Figure 10A). Les gènes *VGLL4* de vertébrés présentent une structure très conservée avec 6 exons codant des protéines de 266 à 296 acides aminés (Tableau 3). Bien qu'ils diffèrent très légèrement de par la taille de leurs exons, les gènes *Vgll4* présentent un profil d'épissage identique. Les deux domaines Tondu, de 10 acides aminés chacun, sont codés par le dernier exon et sont strictement espacés par une séquence de 18 acides aminés. L'analyse des banques de données révèle l'existence de formes alternatives de la protéine ce qui suggère l'existence de deux promoteurs alternatifs permettant de générer des protéines avec une extrémité N-terminale différente (Tableau 1, Simon et al., 2015). Les gènes *VGLL4* mammifère, aviaire et amphibien ont une structure totalement conservée avec deux promoteurs mais le manque d'information ne permet pas d'établir si c'est le cas pour les gènes de poissons. De la même manière que pour les gènes *Vgll1* et *Vgll2*, le poisson-zèbre possède deux gènes homéologues *vgll4a* et *vgll4b* situés sur des chromosomes différents. Les deux domaines Tondu de la protéine *Vgll4* sont impliqués dans son interaction avec les protéines TEAD (Chen et al., 2004b; Guo et al., 2013; Koontz et al., 2013). La protéine VGLL4 est capable, de la même façon que la protéine VGLL2, d'interagir avec le facteur de transcription MEF2 (Chen et al., 2004b). La recherche dans les banques de données des gènes *VGLL4* montre que la synténie des gènes *VGLL4* est très conservée entre les différentes espèces de vertébrés (Figure 10A ; Simon et al., 2015).

Contrairement aux gènes *Vgll1-3* ayant une expression restreinte à un tissu, le gène *Vgll4* est exprimé chez l'homme et l'amphibien dans le cœur, le cerveau et le rein et à des niveaux plus faibles dans d'autres tissus. Dans l'embryon de xénope, il possède également une expression dans plusieurs territoires tels que l'œil, le tube neural, le cerveau et les somites (Figure 10C et 10D) (Chen et al., 2004b; Faucheux et al., 2010).

La fonction de la protéine VGLL4 a été initialement caractérisée dans les myocytes cardiaques où elle régule l'expression des gènes en réponse à une stimulation $\alpha 1$ adrénergique (Chen et al., 2004b). Dans ces expériences, la protéine agit comme un régulateur négatif de la transcription induite par le facteur de transcription TEAD1 (Chen et al., 2010c). Récemment, plusieurs études ont contribué à une meilleure connaissance de la fonction de VGLL4. Le gène *Vgll4* a tout d'abord été proposé comme gène suppresseur de tumeur dans le cancer du pancréas (Mann et al., 2012). Des travaux complémentaires, chez la drosophile et en cellules de mammifères, ont démontré de façon indépendante que la protéine VGLL4 était un régulateur négatif de la voie Hippo entrant directement en compétition pour la liaison entre les protéines YAP1 et TEAD (Guo et al., 2013, Koontz et al., 2013). La protéine agit ainsi comme suppresseur de tumeur dans le cancer du foie et du poumon (Koontz et al., 2013; Zhang et al., 2014b). Les deux domaines Tondus de la protéine sont suffisants pour inhiber l'activité de la protéine YAP1 (Jiao et al., 2014).

L'expression du gène humain *VGLL4* est régulée dans les cellules cancéreuses gastriques par le micro-ARN miR-222, ce dernier étant lui-même induit par le facteur TEAD1 (Li et al., 2015b). Ceci suggère une boucle de régulation positive qui maintient à un faible niveau l'expression de la protéine VGLL4. La fonction suppresseur de tumeur de la protéine a été confirmée dans plusieurs cancers humains et cette propriété pourrait être la conséquence directe de son action sur la voie Hippo au niveau du complexe protéique TEAD-YAP1 (Jiang et al., 2015). La protéine VGLL4 a également été décrite comme régulateur positif de la survie des cellules souches embryonnaires murines (hESCs) en diminuant la mort cellulaire induite par le stress (Tajonar et al., 2013). Ceci contraste avec les travaux qui montrent que la protéine est capable de relocaliser les protéines inhibitrices d'apoptose (IAP) dans le noyau et ainsi contrecarrer leur activité anti-apoptotique (Jin et al., 2011).

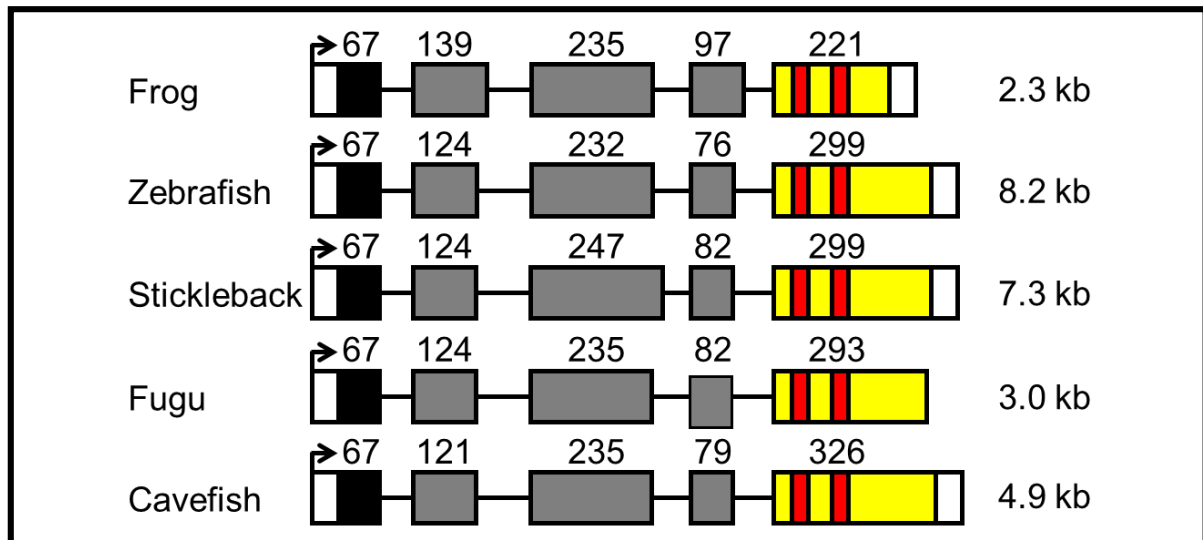


Figure 11 : Structure du gène *Vestigial-like 4l* dans différentes espèces.

La taille des régions codantes est indiquée en nucléotides au-dessus de chaque exon. La taille des gènes est indiquée sur la droite. Les séquences codant le domaine Tordu sont en rouge et les exons correspondants sont en jaune. Les exons contenant le site d'initiation de la traduction sont en noir. Les régions 5' et 3' non traduites sont en blanc.

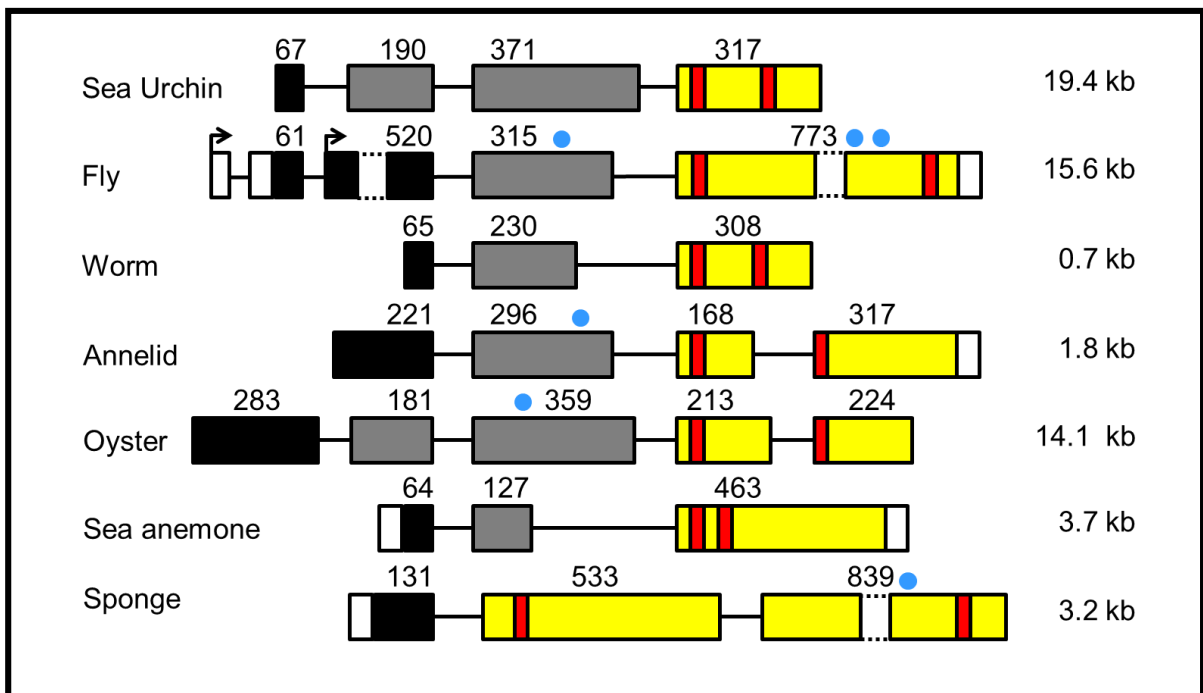


Figure 12 : Structure du gène *vestigial-like 4* chez les invertébrés.

La taille des régions codantes est indiquée en nucléotides au-dessus de chaque exon. La taille des gènes est indiquée sur la droite. Les séquences codant le domaine Tordu est en rouge et les exons correspondants en jaune. Les exons contenant le site d'initiation de la traduction sont en noir. Les régions 5' et 3' non traduites sont en blanc et les motifs PPxY de tgi indiqués par des points bleus.

2. Les gènes *Vestigial-like 4 like* chez les vertébrés

Un gène distinct du gène *vgll4* mais capable comme lui de coder une protéine avec deux domaines Tondu a été identifié chez le poisson-zèbre et le xénope (Barrionuevo et al., 2014, Melvin et al., 2013) (Tableau 1). Ce gène, nommé *vestigial-like 4-like* (ou *vgll4l*), code des protéines de 252 ou 266 acides aminés chez le xénope et le poisson-zèbre respectivement. Ces protéines ne présentent que 30 à 40% d'identité avec *vgll4* excepté au niveau du domaine Tondu. Aucun gène *vgll4l* n'a été identifié chez le poulet, la souris et l'humain suggérant que les gènes *Vgll4* et *Vgll4l* sont des gènes homéologues qui ont évolué à partir d'un évènement de duplication dans le lignage commun des poissons et des amphibiens. La structure des gènes *vgll4l* est très conservée avec 5 exons et leur taille ne présente que des variations minimales (Figure 11) (Barrionuevo et al., 2014). Les deux domaines Tondu sont situés sur le dernier exon et séparés par une séquence de 15 acides aminés (poisson-zèbre) ou 18 acides aminés (xénope) respectivement. Chez le xénope, les deux gènes *vgll4* et *vgll4l* sont exprimés tous les deux dans les cellules de la crête neurale en migration (Barrionuevo et al., 2014). Chez le poisson zèbre, le knockdown de *vgll4l* affecte le développement craniofacial (Melvin et al., 2013).

3. Le gène *Tgi* de drosophile, orthologue du gène *Vestigial-like 4*

Jusqu'à très récemment, le gène *vestigial* était le seul gène décrit chez la drosophile codant pour une protéine avec un unique domaine Tondu. Depuis, un second gène, codant une protéine avec deux domaines Tondu (TDU1 et TDU2), a été décrit (Figure 12). Ce gène, nommé *Tgi* (pour Tondu-domain containing Growth inhibitor), a été identifié lors d'un criblage visant à trouver de nouveaux acteurs de la voie Hippo (Koontz et al., 2013). Le gène a également été identifié (et nommé *SdBP*) de façon indépendante dans un crible double hybride chez la levure dont le but était de trouver des nouveaux partenaires de la protéine *Sd* (Guo et al., 2013) (Tableau 1). L'analyse phylogénétique montre que la protéine *Tgi* est l'orthologue de la protéine *VGLL4* initialement décrite chez les mammifères (Koontz et al., 2013).

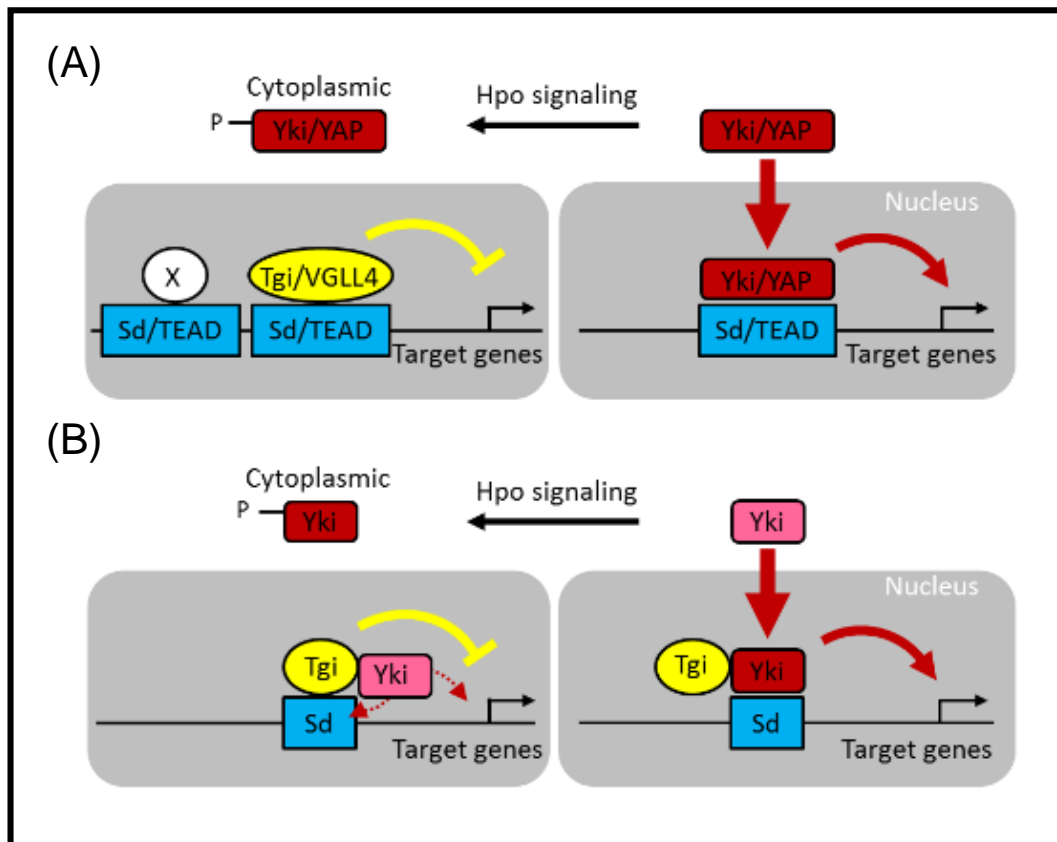


Figure 13: Modèles proposés pour la fonction du complexe protéique VGLL4/Tgi comme un nouveau composant de la voie Hippo.

Les protéines Yorkie (Yki) chez la drosophile ou YAP1 chez les vertébrés sont des effecteurs de la voie Hippo avec Scalloped (Sd) chez la drosophile ou TEAD chez les vertébrés.

(A) Modèle 1 : quand la voie de signalisation Hippo est active, le complexe Yki/YAP1 est phosphorylé et cytoplasmique. La protéine Tgi/VGLL4 est nucléaire et peut se lier à Sd/TEAD et réprimer les gènes cibles. Un autre co répresseur (protéine X) existe probablement d'après les données obtenues chez la drosophile. En absence de la voie Hippo, la protéine Yki/YAP1 est nucléaire et active les gènes cibles. Modèle adapté de Koontz et al., 2013.

(B) Modèle 2 : l'interaction entre les protéines Tgi et Yki est aussi importante que celle entre Tgi et Sd. Quand la voie Hippo est active, Tgi entre en compétition avec Yki pour la liaison à Sd, Tgi interagit aussi avec Yki et entraîne sa rétention nucléaire et son dysfonctionnement (flèche en pointillé rouge). En absence de la voie Hippo ou dans le cas de la surexpression de Yki, Yki est nucléaire et peut entrer en compétition efficacement avec Tgi de façon concentration dépendante pour activer les gènes cibles. Modèle adapté de Guo et al., 2013.

Les deux domaines TDU1 et TDU2 de la protéine Tgi ont 10 acides aminés chacun et sont très conservés par rapport aux deux domaines Tondu de la protéine humaine VGLL4. Ils sont situés dans le dernier exon mais espacés de 219 acides aminés, au lieu de 18 dans les protéines Vgll4 de vertébrés. Le gène *Tgi* est plus petit (15,6 kb) que ses orthologues vertébrés qui possèdent des introns plus grands (Figure 12, Simon et al. 2015).

Tout comme les gènes *VGLL4* de vertébrés, le gène *Tgi* de drosophile possède deux promoteurs alternatifs qui permettent la production de deux transcrits (RA et RB). Les deux protéines produites par *Tgi* ont une taille de 382 et 535 acides aminés mais n'ont pas de différences fonctionnelles ou de localisation subcellulaire (Guo et al., 2013; Koontz et al., 2013). En plus des domaines TDU1 et TDU2 qui permettent l'interaction entre la protéine Tgi et la protéine Sd, la protéine Tgi possède trois motifs PPxY qui permettent son interaction avec des protéines à domaines WW comme la protéine Yorkie qui est l'effecteur de la voie Hippo. Le gène *Tgi* est exprimé de manière ubiquitaire dans les disques imaginaux de l'œil et de l'aile et chez l'adulte.

La protéine Tgi est un répresseur de la voie Hippo. Elle interagit directement avec le facteur de transcription Sd et inhibe l'activation transcriptionnelle du complexe Sd-Yki (Guo et al., 2013; Koontz et al., 2013). La protéine peut interagir avec Sd ou avec Yki, mais l'interaction Tgi-Sd joue un rôle plus critique que l'interaction Tgi-Yki. Lorsque la protéine est liée à Sd, elle agit par défaut comme répresseur des gènes cibles (Koontz et al., 2013). Alors que la protéine Yki a besoin d'interagir avec le facteur Sd pour réguler la croissance des tissus, Sd n'est pas indispensable pour la croissance des tissus et la survie cellulaire. En effet, en absence de la protéine Yki, le complexe Sd-Tgi réprime les gènes cibles impliqués dans la croissance des tissus et la survie cellulaire, alors qu'en absence de la protéine Sd, ces gènes restent exprimés à des niveaux de base. Un modèle a été proposé dans lequel, les niveaux physiologiques de la protéine Yki entraînent la croissance normale des tissus non pas en activant la transcription mais en bloquant l'activité répresseur du complexe protéique Sd-Yki (Koontz et al., 2013) (Figure 13A, Simon et al. 2015). Un autre modèle a été proposé où l'interaction Tgi-Yki est aussi importante que l'interaction Tgi-Sd (Guo et al., 2013). Dans ce modèle, les protéines Tgi et Yki sont en compétition pour leur interaction avec la protéine Sd de manière dépendante de la concentration. Dans la situation où la protéine Tgi est en excès, elle se lie au complexe protéique Sd-Yki dans le noyau et

inhibe son activité transcriptionnelle En absence de la signalisation Hippo ou dans le cas d'un excès de protéine Yki, le complexe Sd-Yki est dominant et activateur transcriptionnel, indépendamment de la présence de la protéine Tgi (Figure 13B, Simon et al., 2015).

L'effet de la protéine Tgi de drosophile sur la croissance des tissus peut être reproduit en surexprimant la protéine humaine VGLL4 confirmant ainsi que les deux protéines sont bien orthologues (Koontz et al., 2013). De plus, le rôle inhibiteur de la protéine VGLL4 sur la croissance induite par l'oncogène YAP1 (orthologue Yki chez les mammifères) a été démontré dans un modèle de souris où la protéine YAP1 est surexprimée dans le foie. Dans ce modèle, les souris développent un carcinome hépatique dont la formation peut être inhibée par la surexpression de la protéine VGLL4 (Koontz et al., 2013). Depuis, plusieurs études ont confirmé les fonctions anti-oncogéniques de la protéine VGLL4 dans différents modèles de carcinomes (Jiao et al., 2014; Li et al., 2015a; Zhang et al., 2014b). L'ensemble de ces travaux conduit à la conclusion que les deux protéines de drosophile Vestigial et Tgi, diffèrent non seulement de par leur structure (un domaine Tondu pour Vestigial versus deux domaines pour Tgi) mais aussi de par leur fonction qui est soit activatrice (Vestigial) soit inhibitrice (Tgi) *via* leur liaison avec le facteur de transcription Sd.

4. Les gènes *Vestigial-like 4* chez les invertébrés hormis la drosophile

La recherche dans les banques de données de gènes codant des protéines avec deux domaines Tondu de 10 acides aminés a permis d'identifier des gènes homologues du gène *Vgll4* chez l'anémone de mer, l'éponge et les protistes (Figure 12 ; Koontz et al. 2013 ; Simon et al., 2015). Les protéines codées par ces gènes appartiennent à la sous-famille VGLL4/Tgi de protéines contenant deux domaines Tondu.

Chez les invertébrés, ces gènes, à la différence des gènes de vertébrés, présentent une grande variation dans le nombre d'exons qui va de 3 pour l'anémone à 6 chez la drosophile (Figure 12, Simon et al. 2015). La taille de ces gènes varie de 3,2 kb chez l'éponge à plus de 19,4 kb chez l'oursin.

Il n'y a pas d'évidence de l'existence de deux promoteurs pour cette famille de gènes chez les invertébrés. Les gènes *VGLL4/Tgi* sont beaucoup plus petits chez les invertébrés que chez leurs orthologues vertébrés et les deux domaines TDU1 et TDU2 sont espacés par une région variable de 20 acides aminés chez l'anémone à 219 acides aminés chez la drosophile contre une région constante de 18 acides aminés chez les vertébrés. Plus surprenant, les deux domaines sont codés par deux exons successifs chez l'annélide, l'huître et l'éponge suggérant une évolution complexe de la structure du gène ancestral.

Les domaines PPxYi, présents dans la protéine Tgi de drosophile ne sont pas retrouvés dans les protéines Vgll4 des vertébrés mais présents dans les gènes de l'huître et de l'éponge (Figure 12). Ceci suggère que la capacité des protéines VGLL4/Tgi à interagir avec les protéines YAP1/Yorkie était présente très tôt au cours de l'évolution mais a été perdue depuis la séparation des protostomiens et deutérostomiens.

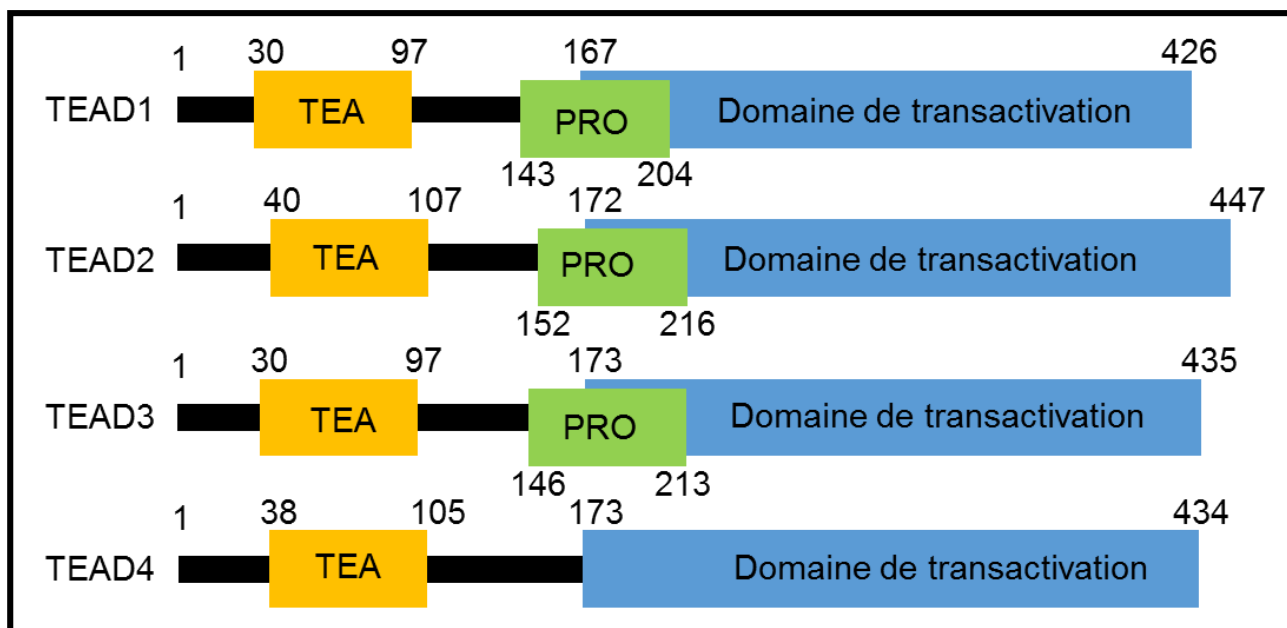


Figure 14 : Structure des protéines TEAD de mammifères.

Les différents domaines sont représentés par des boîtes de couleurs différents: le domaine TEA en orange, le domaine de transactivation en bleu et le domaine riche en proline (PRO) en vert.

	TEAD1	TEAD2	TEAD3	TEAD4
HOMME	hTEF-1 (1)	hTEF-4 (2)	hTEF-5 (3)	hTEF-3 (2)
SOURIS	mTEF-1 (4)	mTEF-4 (2) mETF (5)	ETFR-1 (6)	mTEF-3 (2) TEFR-1 (7) ETFR-2 (6) FR19 (8)
POULET	cNTEF-1 (9)	ND	cDTEF-1 (9)	cRTEF-1 (9)
XENOPE	Tead1 (10)	Tead2 (10)		
POISSON			Tead3 (11)	

Tableau 5 : Comparaison de la nomenclature des protéines TEAD de vertébrés.

Les homologues des gènes humains (h), souris (m) et poulet (c) sont indiqués ainsi que les protéines de xénope et poisson-zèbre. Les chiffres entre parenthèses correspondent aux références suivantes : (1) Xiao et al. 1991, (2) Jacquemin et al. 1996, (3) Jacquemin et al. 1997, (4) Shimuzu et al. 1993, (5) Yasunami et al. 1995, (6) Yasunami et al. 1996, (7) Yockey et al. 1996, (8) Hsu et al. 1996, (9) Azakie et al. 1996, (10) Naye et al. 2007, (11) Mann et al. 2005. ND, Non Détecté.

II. Les protéines TEAD et leurs cofacteurs

Les protéines TEAD constituent une famille de facteurs de transcription très conservés en termes de séquence et de structure et ayant un rôle important dans le développement et le cancer (Figure 14). Elles ont pour caractéristique principale de posséder un domaine de liaison à l'ADN, ou domaine TEA, de 66 à 68 acides aminés. Cette caractéristique se retrouve uniquement dans cette famille de facteur de transcription.

Les facteurs de transcription sont regroupés en classes et superclasses selon la structure de leur domaine de fixation à l'ADN. Parmi ces superclasses, on peut citer :

- Les facteurs de transcription en doigt de zinc tels que les facteurs de transcription à hormones stéroïdes. Le motif doigt de zinc est constitué d'histidine et cystéine qui se lient à des atomes de zinc.
- Les facteurs de transcription hélice tour hélice qui comportent de plusieurs sous classes :
 - Les facteurs à homéodomaine tels que les protéines Hox. Un homéodomaine est un repliement spécifique présent uniquement chez les eucaryotes.
 - Les facteurs paired-box représentés par les protéines pax.
 - Les facteurs de transcription avec le domaine TEA représentés par la seule famille des protéines Tead.
- Les facteurs de transcription à domaine basique :
 - basique hélice-boucle-hélice (bHLH) tels que les protéines NeuroD ou MyoD. La région basique N-terminale est impliquée dans la fixation à l'ADN et la région HLH C-terminale est impliquée dans la dimérisation.
 - basique leucine zipper. Le motif leucine zipper est un motif de bobine enroulée (coiled coil).
- Les facteurs de transcription à domaine ETS (E26 Transformation Specific), contient plus de 25 membres.

Les protéines TEAD ont été caractérisées dans de nombreux organismes et la nomenclature des gènes TEAD a été harmonisée, comme indiqué dans le Tableau 5.

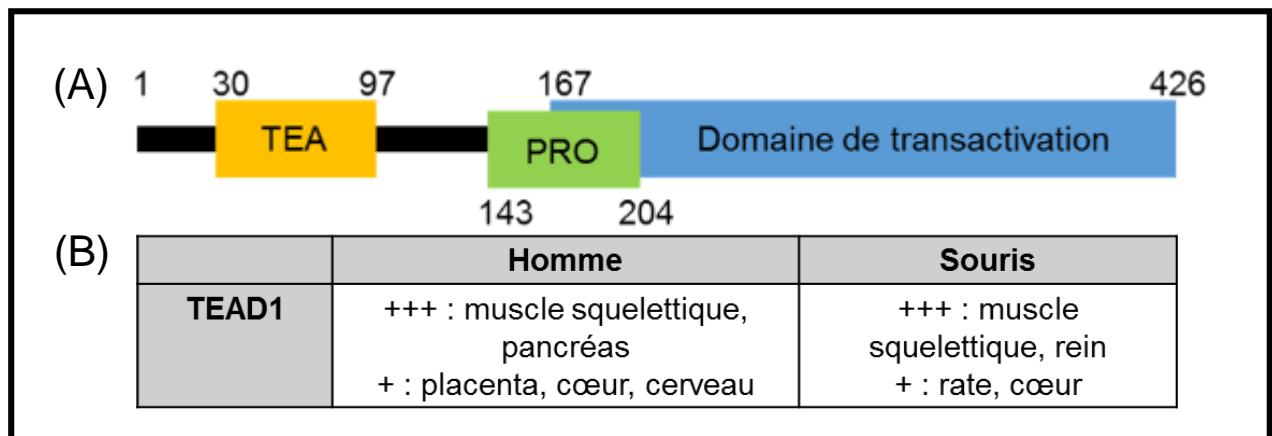


Figure 15 : Structure de la protéine TEAD1 de mammifère et expression du gène.

(A) Représentation schématique de la structure de la protéine. Le domaine TEA est représenté par une boîte orange, le domaine riche en proline (PRO) par une boîte verte et le domaine de transactivation par une boîte bleue.

(B) Tableau présentant l'expression du gène *TEAD1* chez l'homme et la souris.

KO	Conséquences
TEAD1	Létal E11.5 (défaut cardiaque) (1)
TEAD2	Exencephaly (Altération du développement neural) (2) Normal (3)
TEAD1/TEAD2	Létal E9.5 (3)
TEAD4	Blocage du développement du trophectoderme (4)

Tableau 6 : Comparaison des effets de l'inactivation des gènes (KO) *TEAD* chez la souris.

Les chiffres entre parenthèses correspondent aux références suivantes : (1) Chen et al. 1994, (2) Kaneko et al. 2007, (3) Sawada et al. 2008, (4) Yagi et al. 2007.

A. Les protéines TEAD dans les différents organismes

1. Les protéines TEAD chez les mammifères

a. TEAD1

La protéine TEAD1 (ou TEF-1) a été décrite chez l'homme comme activateur de l'enhancer du virus SV40 (Davidson et al., 1988). Elle active également les oncogènes E6 et E7 produits par le virus de papillome humain (ou HPV-16). La protéine humaine est composée de 426 acides aminés avec le domaine TEA en position N-terminale, un domaine riche en proline et un domaine de transactivation situé dans la région C-terminale (Figure 15A). Le gène *TEAD1* humain est fortement exprimé dans le muscle squelettique et le pancréas, plus faiblement dans le placenta, le cœur et le cerveau (Figure 15B). L'ARNm n'est pas détecté dans le foie, le poumon et le rein (Stewart et al., 1996). Chez la souris, le gène est fortement exprimé dans le muscle squelettique et le rein (Figure 15B). Différentes études décrivent des résultats contradictoires quant au niveau d'expression dans le cœur (Blatt and DePamphilis, 1993; Shimizu et al., 1993). En ce qui concerne son expression temporelle, le gène murin est exprimé dans l'ovocyte puis à partir du huitième jour après fécondation (Jacquemin et al., 1996).

La protéine TEAD1 se lie sur une séquence consensus de type 5'-CATTCCT-3' appelée MCAT (pour Muscle CAT) initialement décrite dans le promoteur du gène troponine T cardiaque (Mar and Ordahl, 1988). Cette séquence est présente dans de nombreux promoteurs de gènes musculaires cardiaques (Jiang et al., 2000), lisses (Swartz et al., 1998) et squelettiques (Karns et al., 1995). La perte de fonction *Tead1* chez la souris conduit à une mortalité embryonnaire entre E11 et E12 avec des altérations du muscle cardiaque (Tableau 6) (Chen et al., 1994). La surexpression de la protéine dans l'embryon de souris provoque un dysfonctionnement du cœur dépendant de l'âge et une diminution de la puissance du ventricule gauche (Tsika et al., 2008).

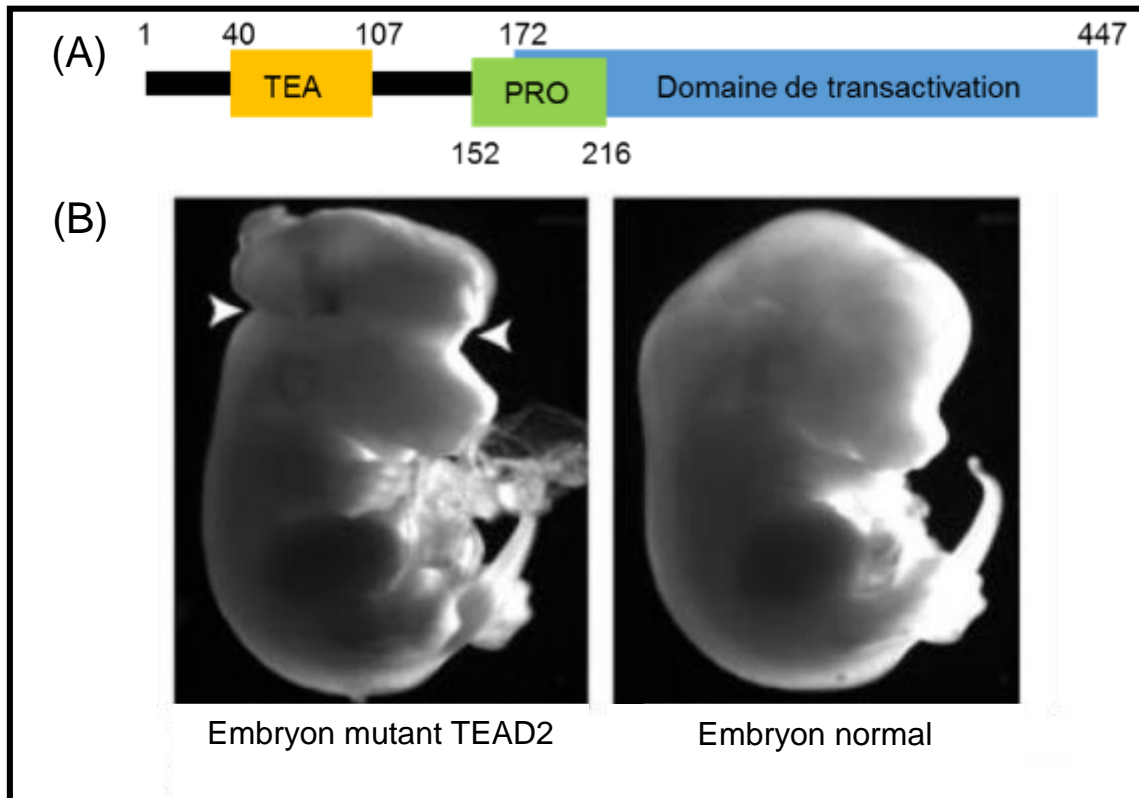


Figure 16 : Structure de la protéine TEAD2 de mammifère et fonction du gène.

(A) Représentation schématique de la structure de la protéine. Le domaine TEA est représenté par une boîte orange, le domaine riche en proline (PRO) par une boîte verte et le domaine de tansactivation par une boîte bleue.

(B) *TEAD2* est impliqué dans la formation du tube neural. A gauche, un embryon mutant pour *TEAD2* présente un défaut de formation du tube neural (Kaneko et al., 2007).

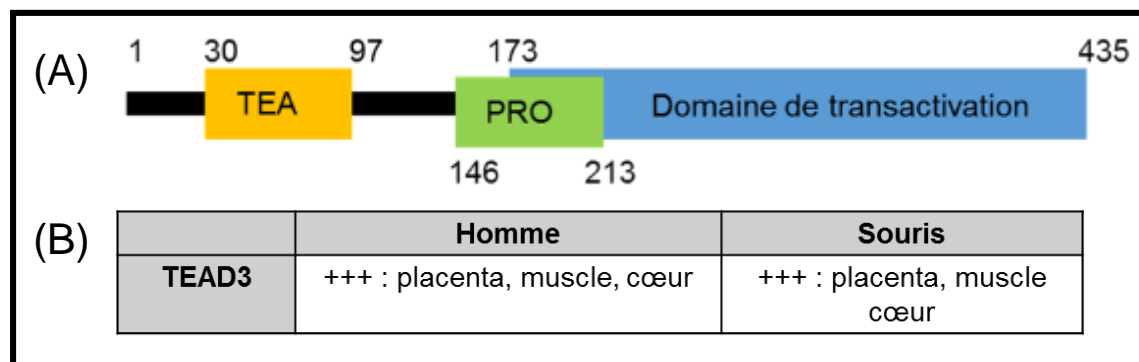


Figure 17 : Structure de la protéine TEAD3 de mammifère et expression du gène.

(A) Représentation schématique de la structure du gène. Le domaine TEA est représenté par une boîte de couleur orange, la boîte verte représente le domaine riche en proline (PRO) et le domaine bleu le domaine de tansactivation.

(B) Tableau présentant l'expression de *TEAD3* chez l'homme et la souris.

b. TEAD2

Le gène *TEAD2* (ou *TEF-4*) a été identifié chez la souris comme un gène exprimé dans les précurseurs neuraux des cellules fœtales (Yasunami et al., 1996). Le gène code une protéine qui possède, comme la protéine TEAD1, un domaine TEA dans sa région N-terminale, un domaine riche en proline et un domaine de transactivation dans la portion C-terminale (Figure 16A). Le gène est fortement exprimé au cours des premiers jours de développement de la souris avec un niveau d'expression qui augmente jusqu'au 9^{ème} jour puis qui diminue entre le 9^{ème} et le 18^{ème} jour (Yasunami et al., 1996). Bien que le gène soit exprimé dans la plupart des tissus adultes, il semble jouer un rôle préférentiel au cours du développement neural car son inactivation chez la souris entraîne un défaut de fermeture du tube neural (Figure 16B) (Jacquemin et al., 1994; Kaneko et al., 2007) (Tableau 6). Ces résultats sont soumis à caution car des observations contradictoires sur le phénotype des souris *Tead2* *-/-* ont été publiées par ailleurs (Tableau 6) (Sawada et al., 2008). Par contre, les souris doubles mutantes pour *Tead1* et *Tead 2* ne sont pas viables et meurent à E9.5 (Tableau 6) (Sawada et al. 2008). Chez la souris, le gène *Tead2* régule l'expression du gène *Pax3* qui est essentiel à la migration et à la différenciation des cellules de la crête neurale (Milewski et al., 2004). Il régule aussi le gène *Foxa2* impliqué dans le développement de la notochorde (Sawada et al., 2005). *TEAD2* est également exprimé dans les cellules souches embryonnaires et il semble être nécessaire à l'auto-renouvellement de ces cellules (Ramalho-Santos et al., 2002).

c. TEAD3

Le gène *TEAD3* (ou *TEF-5*) a été initialement décrit chez l'homme (Jacquemin et al., 1999). Il code pour une protéine qui présente les mêmes caractéristiques que les autres membres de la famille TEAD (domaine TEA, domaine riche en proline et un domaine de transactivation) (Figure 17A). Il est exprimé principalement dans le placenta mais aussi dans les tissus musculaires squelettique et cardiaque et très faiblement dans le foie (Figure 17B).

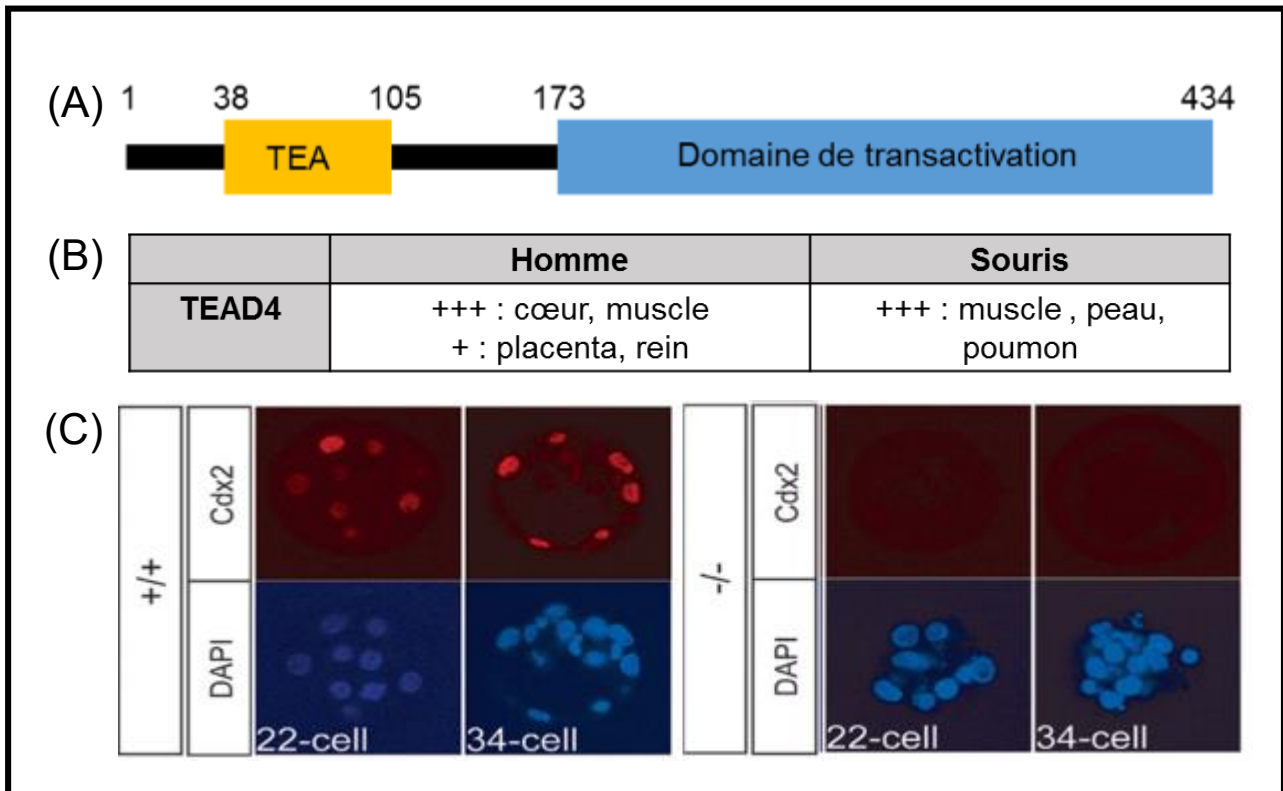


Figure 18 : Structure de la protéine TEAD4 de mammifère, expression et fonction du gène.

(A) Représentation schématique de la structure de la protéine. Le domaine TEA est représenté par une boîte orange et le domaine de transactivation par une boîte bleue.

(B) Tableau représentant l'expression du gène *TEAD4* chez l'homme et la souris.

(C) *TEAD4* est impliqué dans la formation du trophoctoderme. Les embryons de souris *tead4*^{-/-} présentent une diminution de l'expression du gène *cdx2* marqueur du trophoctoderme (Yagi et al., 2007).

Chez la souris, le gène *Tead3* a une forte expression placentaire et une faible expression embryonnaire (Jacquemin et al., 1999). Dans les cellules placentaires, la protéine TEAD3 active le gène codant la somatomammotropine chorionique humaine B (Jiang et al., 1999). La protéine peut aussi activer le gène α -actine dans des cellules de muscle squelettique après stimulation α 1-adrénergique suggérant qu'elle pourrait avoir un rôle dans la régulation des gènes musculaires lors du développement musculaire (Maeda et al., 2002d).

d. TEAD4

Le gène *TEAD4* (ou *TEF-3*) a été caractérisé dans plusieurs espèces et il code une protéine ayant la même structure que les autres protéines de la famille à la différence qu'elle ne possède pas de domaine riche en proline (Figure 18A). Le gène *TEAD4* est fortement exprimé dans les muscles squelettiques et son expression augmente lors de la différenciation des myoblastes en myotubes (Yockey et al., 1996) (Figure 18B). La protéine Tead4 est essentielle, chez la souris, au développement du trophoctoderme (Nishioka et al., 2008; Yagi et al., 2007). En effet, les embryons de souris *tead4*^{-/-} ne produisent pas de cellules souches trophoblastiques, ne s'implantent pas dans l'utérus et n'expriment pas le gène marqueur du trophoctoderme *Cdx2* (Tableau 6) (Figure 18C) (Yagi et al., 2007). Ces résultats sont en accord avec l'observation que dans les cellules souches murines ES (déficientes en *Cdx2*), la surexpression de TEAD4 favorise la différenciation des trophoblastes et du trophoctoderme (Nishioka et al., 2008).

2. Les protéines TEAD dans les autres organismes

Les protéines TEAD sont apparues très tôt au cours de l'évolution et elles sont déjà présentes chez l'amibe et la levure (Figure 2; Simon et al., 2015). Chez la drosophile, la protéine orthologue des protéines TEAD de mammifères est la protéine *Scalloped* (*Sd*) et son domaine TEA présente 99% d'identité avec le domaine TEA de la protéine TEAD1 humaine.

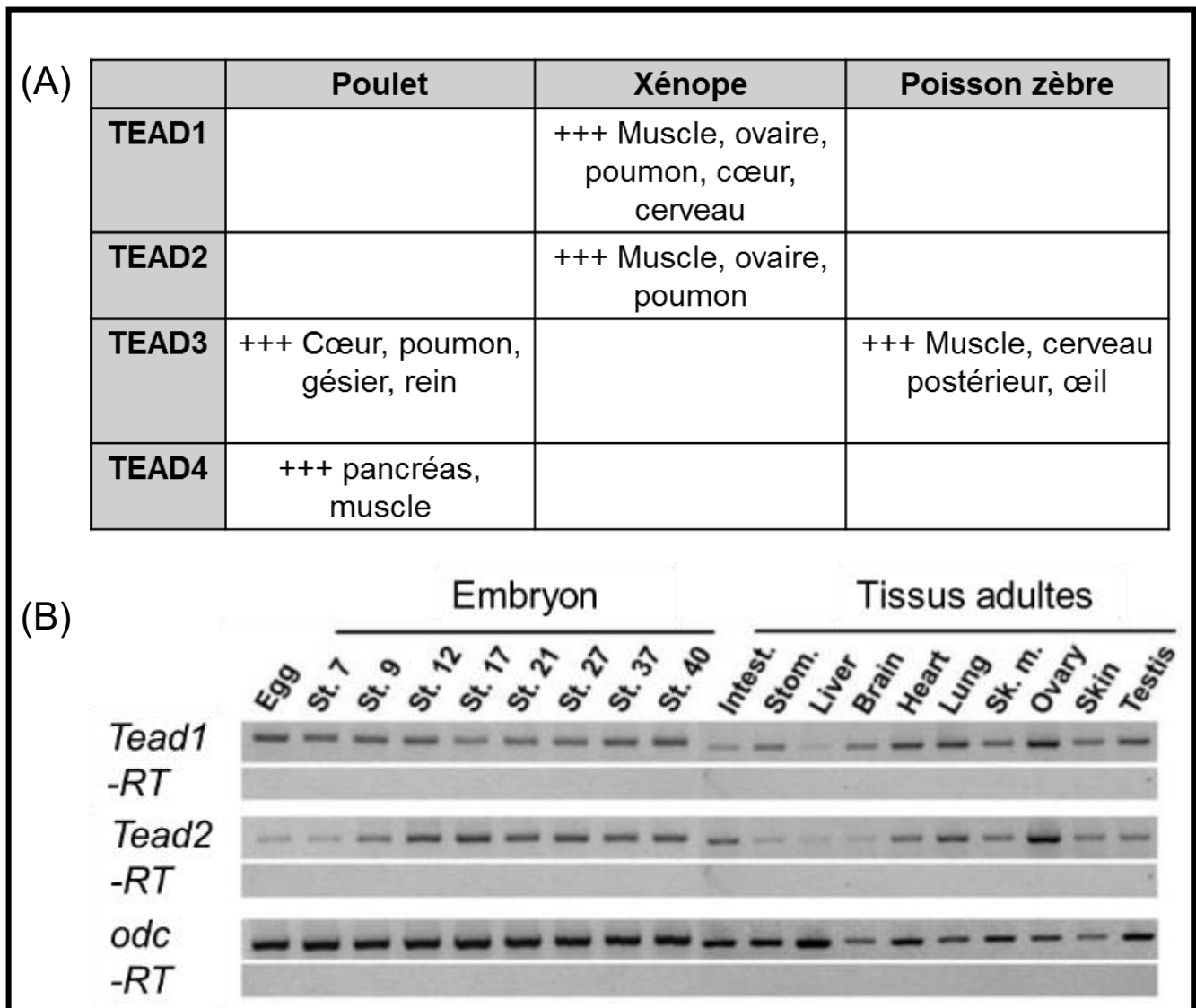


Figure 19 : Expression des gènes TEAD chez les autres organismes.

(A) Tableau représentant l'expression des gènes de la famille TEAD chez le poulet, le xénope et le poisson-zèbre.

(B) Analyse par RT-PCR de l'expression de *tead1* et *tead2* dans l'embryon et dans les tissus adultes du xénope (Naye et al., 2007).

Le gène *Sd* a été initialement caractérisé chez la drosophile grâce à des mutants dont les ailes sont réduites (Figure 5C). Le gène *Sd* est également exprimé dans le système nerveux central et les organes sensoriels de l'embryon. Chez la drosophile adulte, il est exprimé uniquement dans une zone du cerveau impliquée dans l'analyse des informations gustatives (Campbell et al., 1992; Campbell et al., 1991). Trois gènes *TEAD* (*TEAD1*, *TEAD3* et *TEAD4*) ont été caractérisés chez le poulet (Tableau 5) (Azakie et al., 1996; Stewart et al., 1994). Le gène *TEAD3* est exprimé dès la 16^{ème} heure de l'embryogenèse au niveau du cœur embryonnaire, du poumon, du rein et du gésier (Azakie et al., 1996) mais, contrairement aux mammifères, il est faiblement exprimé dans le muscle squelettique (Figure 19A). Le gène *TEAD4* est très faiblement exprimé dans le cerveau et le foie, en revanche, il est fortement exprimé dans le pancréas et le muscle squelettique (Stewart et al., 1994) (Figure 19A).

Il n'existe chez l'amphibien xénope que deux des gènes *tead* (*tead1* et *tead2*) (Figure 19A) (Naye et al., 2007). Les deux gènes sont exprimés dans l'ovocyte et tout au long du développement embryonnaire dans l'œil, le cerveau et les somites (Naye et al., 2007) (Figure 19B). L'expression des deux gènes est activée dans les cellules pluripotentes de calotte animale par FGF2, inducteur du mésoderme ventral, mais pas par l'activine, inducteur du mésoderme dorsal (Naye et al. 2007).

Chez le poisson zèbre, au moins trois gènes *TEAD* ont été décrits parmi lesquels *Tead3* qui est exprimé dans les cellules musculaires, le cerveau postérieur et l'œil (Mann et al., 2007) (Figure 19A).

B. Les cofacteurs des protéines TEAD

Les protéines TEAD ne possèdent pas de domaine activateur de la transcription et doivent interagir avec des cofacteurs pour réguler l'expression de gènes cibles. En effet, quand des cellules de mammifères sont cotransfectées avec un vecteur d'expression *TEAD1* et une construction promotrice contenant le site de reconnaissance pour *TEAD1* (MCAT sequence), on observe une inhibition de l'activité promotrice (ou squelching) plutôt qu'une activation (Jiang and Eberhardt, 1995; Xiao et al., 1991). Ceci suggère que la fonction activatrice de *TEAD1* nécessite la présence

d'un cofacteur qui est présent en quantité limitée dans les cellules. Plusieurs travaux ont permis d'identifier des cofacteurs de TEAD qui sont classés en différentes catégories : les cofacteurs impliqués dans la conformation de la chromatine, les cofacteurs se liant à l'ADN et les cofacteurs possédant une activité transcriptionnelle mais ne se liant pas à l'ADN.

1. Les cofacteurs de TEAD impliqués dans la conformation de la chromatine

Deux types de protéines ont été décrits comme étant capables d'interagir avec les protéines TEAD. Les protéines SRC (pour **Steroid Receptor Coactivator**) possèdent des domaines conservés responsables d'interaction avec des effecteurs comme les histones acétyltransférases et méthyltransférase. SRC1 interagit avec les protéines TEAD1 et TEAD2 *via* leur domaine bHLH/PAS (basic helix loop helix/PerArntSlim) (Belandia and Parker, 2000). Les protéines PARP (pour **Poly ADP-Ribose Polymérase**) sont des protéines associées à la chromatine capables de réaliser des modifications post-traductionnelles en ajoutant une chaîne polyA. Elles possèdent un rôle dans la réparation, la réplication, la recombinaison, la transcription et la différenciation et peuvent interagir avec TEAD1 et TEAD4 (Butler and Ordahl, 1999).

2. Les cofacteurs de TEAD se fixant à l'ADN

Plusieurs protéines capables de se lier à l'ADN ont été identifiées comme des cofacteurs de TEAD et peuvent ainsi contribuer à l'activité transcriptionnelle du complexe protéique formé. La protéine SRF (pour **Serum Responsive Factor**), qui appartient à la superfamille des facteurs de transcription à boîte MADS (pour **Mcm1, AGAMOUS DEFICIENS, SRF**), est l'un de ces cofacteurs. L'interaction entre les protéines SRF et TEAD se fait par leurs domaines MADS et TEA respectivement. Le complexe protéique formé peut ainsi activer de manière coopérative le promoteur du gène α -actine squelettique dans les cellules cardiaques (MacLellan et al., 1994). La protéine MEF2 (pour **Myocyte Enhancer Factor 2**) est un autre cofacteur de TEAD. Elle fait partie, comme la protéine SRF, de la superfamille des facteurs de transcription

possédant un domaine MADS. La protéine MEF2 est exprimée dans de nombreux types cellulaires et a un rôle central dans l'activation des programmes génétiques qui contrôlent la différenciation et la prolifération cellulaire ou encore la morphogenèse (Potthoff and Olson, 2007). Dans les cellules de mammifères, les protéines MEF2 et TEAD1 forment un complexe spécifique *via* leur domaines MADS et TEA (Maeda et al., 2002b). Ceci est également observé chez la drosophile où la protéine Scalloped, homologue de TEAD1, interagit avec la protéine DMEF2, l'homologue de MEF2, pour former un complexe activateur qui régule la transcription de gènes cibles dans les cellules musculaires (Bernard et al., 2009; Deng et al., 2009).

La protéine MAX a été décrite comme cofacteur de la protéine TEAD. C'est une phosphoprotéine qui possède un domaine hélice-boucle-hélice et un domaine leucine zipper (ou bHLH-LZ) qui lui permettent d'interagir avec d'autres protéines à domaines bHLH-LZ ou avec d'autres protéines telle que la protéine MAD (Ayer et al., 1993; Berberich and Cole, 1992; Kato et al., 1992). La protéine MAX est aussi capable de former un complexe transcriptionnel avec la protéine TEAD1 (Gupta et al., 1996). Ce complexe peut réguler la transcription du gène codant la chaîne lourde de la myosine cardiaque (ou α -MHC) (Gupta et al., 1997).

3. Les cofacteurs de TEAD conférant une activité transcriptionnelle

Une dernière classe de protéines qui interagissent avec les protéines TEAD sont des protéines qui ne se lient pas à l'ADN mais possèdent une activité transcriptionnelle. Ces protéines confèrent ainsi au complexe protéique formé la capacité d'activer les gènes cibles qui ont une séquence de reconnaissance pour la protéine TEAD1. Parmi ces protéines, on trouve les membres de la famille Vestigial-like décrits auparavant (§1), ainsi que les protéines YAP1 et TAZ.

a. YAP1

La protéine YAP1 (pour **Y**es-**A**ssociated **P**rotein **1**) a été identifiée chez le poulet comme capable d'interagir avec la protéine tyrosine kinase c-Yes qui fait partie de la famille des protéines SRC (Sudol et al., 1995a).

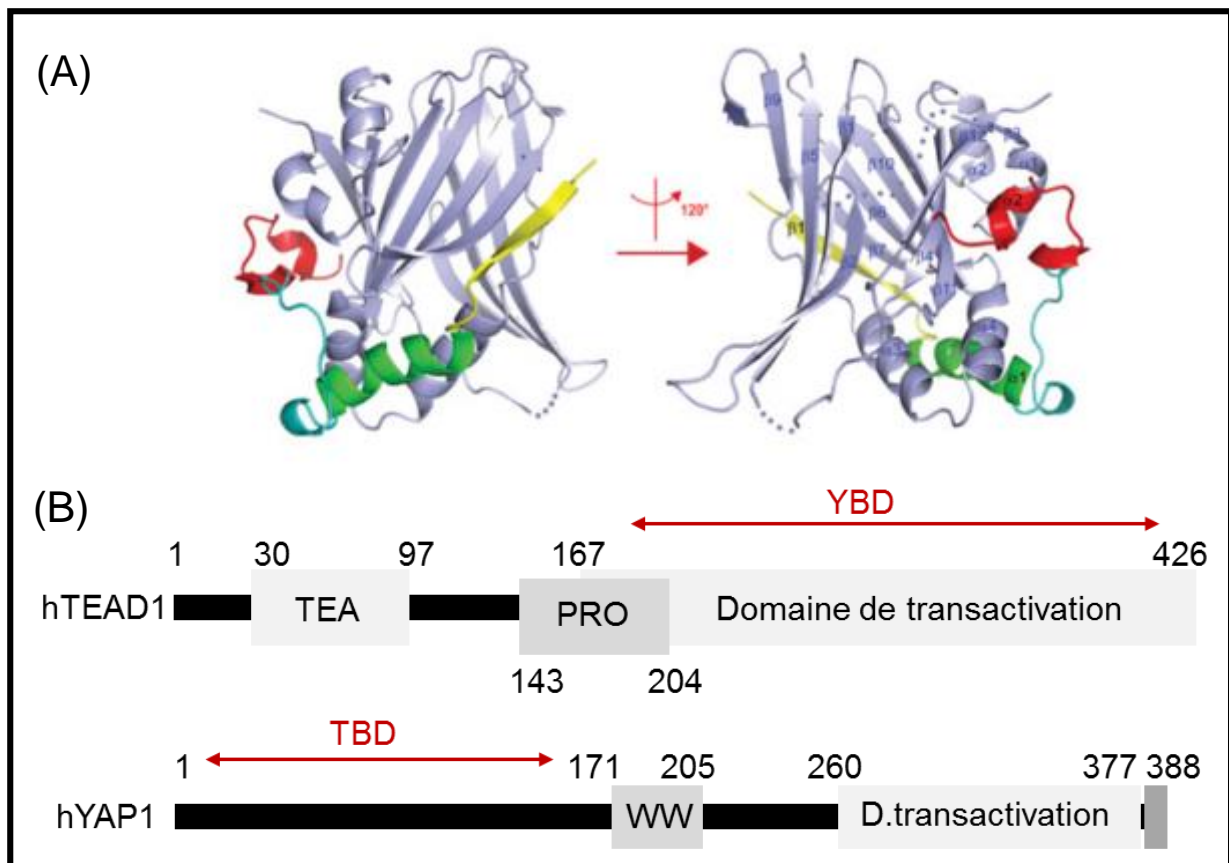


Figure 20 : Représentation schématique de l'interaction entre les protéines YAP1 et TEAD1.

(A) Structure du complexe YAP1-TEAD1 selon la représentation en ruban, les couleurs représentent les différents domaines de YAP1 (en jaune le feuillet β , en vert le domaine $\alpha 1$ et en rouge le domaine $\alpha 2$) (Chen et al 2010).

(B) Représentation schématique de la structure des protéines TEAD1 et YAP1 humaines. YBD, domaine de liaison à la protéine YAP1 ; TBD, domaine de liaison à la protéine TEAD1 (Adapté de Chen et al., 2010).

La protéine YAP1 est présente chez les organismes métazoaires, à l'exception des nématodes, et est très conservée au cours de l'évolution (Hilman and Gat, 2011). Elle a une taille comprise entre 395 acides aminés (chez la drosophile) à 504 acides aminés (chez homme) et interagit avec le domaine SH3 (pour **SRC Homology 3 Domain**) de la protéine c-Yes grâce à une région riche en prolines. La protéine YAP1 possède, selon l'espèce, un ou deux domaines WW qui lui permet d'interagir avec la plupart des autres protéines (Sudol et al., 1995b). La protéine ne possède pas de domaine de liaison à l'ADN et a besoin de facteurs qui se fixent sur le promoteur de gènes cibles pour assurer sa fonction activatrice.

Des expériences de GST-pull down ont confirmé que YAP1 pouvait interagir avec les quatre protéines de la famille TEAD de mammifères (Vassilev et al., 2001). Le domaine d'interaction entre YAP1 et TEAD se situe dans la région C-terminale de la protéine TEAD et constitue le domaine YBD (pour **YAP1 Binding Domain**) (Figure 20). Ce domaine comporte deux feuillets β et deux structures de type hélice-boucle-hélice. Le domaine de YAP1 qui permet l'interaction avec la protéine TEAD (ou TBD pour **TEAD Binding Domain**) est localisé dans la région N-terminale de la protéine (Chen et al., 2010c; Li et al., 2010; Tian et al., 2010) (Figure 20). L'importance de l'interaction entre les protéines TEAD1 et YAP1 dans l'activité transcriptionnelle du complexe TEAD-YAP1 est basée sur des études fonctionnelles en cellules en culture utilisant des systèmes de gènes rapporteurs. La surexpression de la protéine YAP1 dans des cellules fibroblastiques 3T3 de souris, qui expriment de façon endogène les protéines TEAD et YAP1, a pour effet l'augmentation de l'activité d'un système rapporteur contenant une séquence de liaison pour les protéines TEAD. La surexpression de la protéine TEAD, dans ces mêmes cellules, entraîne une répression de l'activité du système rapporteur par un mécanisme de titration d'un cofacteur présent en quantité limitante. Cette répression n'a pas lieu lorsque les protéines TEAD1 et YAP1 sont surexprimées ensemble (Vassilev et al., 2001).

TEAD constitue le partenaire majeur des protéines YAP1 lors des mécanismes d'induction transcriptionnelle des gènes impliqués dans les processus de croissance cellulaire, de transition épithélio-mésenchymateuse et d'inhibition de contact. En effet, en absence des protéines TEAD, la protéine YAP1 n'est plus capable d'exercer son effet inducteur sur l'activité des gènes cibles (Zhao et al., 2008a).

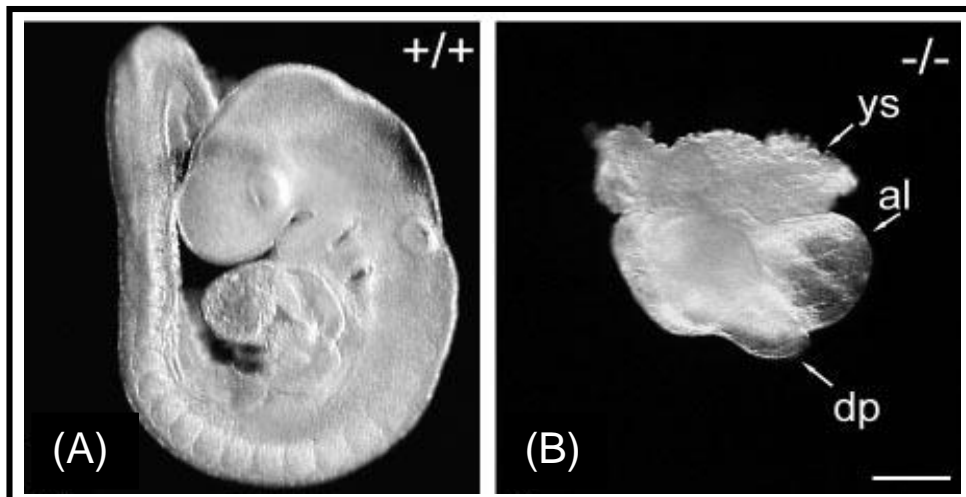


Figure 21 : YAP1 est important pour le développement embryonnaire.

Les souris knock-out (-/-) pour YAP1 (B) ne survient pas au-delà du stade E8.5. (A) embryon normal (+/+) de stade E 8.5 (Morin-Kensicki et al., 2006).

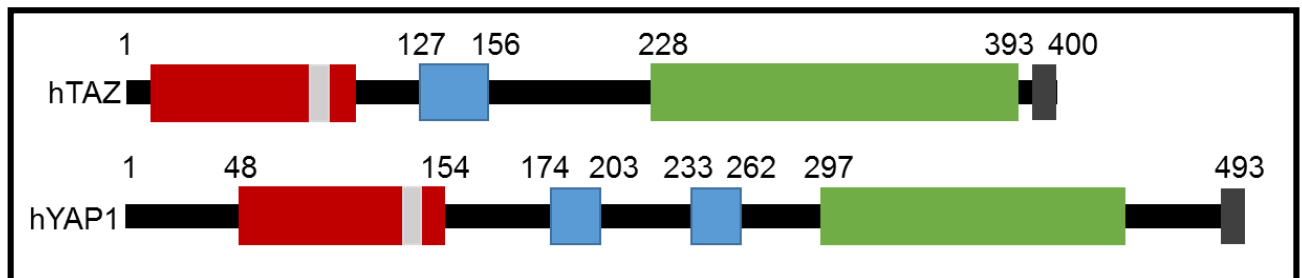


Figure 22 : Structure des protéines TAZ et YAP1 humaines.

Représentation schématique de la structure des protéines. Les différents domaines sont représentés par des boîtes colorées. Les régions d'homologie entre les protéines sont figurées en rouge, les site de liaison à la protéine 14-3-3 en gris clair, les domaines WW en bleu, les domaines de transactivation en vert et le domaine de liaison PDZ en gris foncé (Kanai et al., 2000).

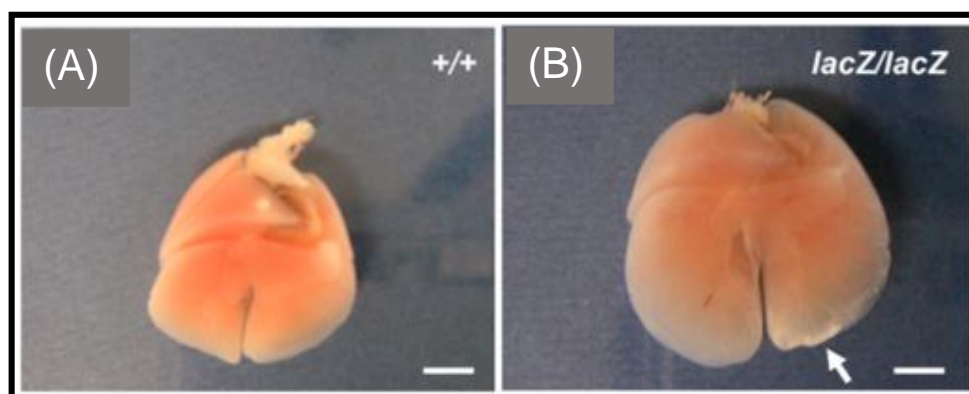


Figure 23 : TAZ est important pour le développement des organes.

(A) Poumons de souris normales âgées de 9 mois.

(B) Les souris déficientes en TAZ présentent des poumons plus larges et plus clairs que les poumons des souris normales (Mitani et al., 2009).

La protéine YAP1 a un rôle essentiel dans le développement embryonnaire et les souris knock-out *YAP1*^{-/-} ne survivent pas au-delà du stade E8.5 (Morin-Kensicki et al., 2006) (Figure 21). Un des rôles majeurs de la protéine YAP1 est d'agir comme effecteur de la voie de signalisation Hippo qui contrôle la taille des organes (Yu and Guan, 2015 ; Zhao et al., 2008). Ainsi, la surexpression de YAP1 dans le foie de souris entraîne une augmentation de la taille de l'organe d'un facteur 5 (Camargo et al., 2007; Dong et al., 2007). La protéine YAP1 a aussi un rôle dans le maintien en pluripotence des cellules souches embryonnaires (ES) et lorsque son expression est bloquée, les cellules souches ES s'engagent en différenciation (Lian et al., 2010).

b. TAZ

La protéine TAZ (pour **T**ranscriptional co-**A**ctivator with **P**DZ binding motif) est un coactivateur de la transcription initialement identifié comme partenaire des protéines de la famille 14-3-3 (Kanai et al., 2000). La protéine contient, comme la protéine YAP1, un domaine WW, et possède un domaine en superhélice (coil-coiled), un domaine de transactivation et un domaine de liaison PDZ en position C-terminale (Figure 22). Les protéines TAZ et YAP1 présentent une forte homologie de séquence, qui est de 45% au niveau du domaine PDZ. Alors que la phosphorylation de TAZ entraîne son interaction avec la protéine 14-3-3 et sa rétention dans le cytoplasme, la protéine sous forme déphosphorylée se localise dans le noyau et agit comme co-activateur de la transcription d'un certain nombre de gènes tels que p63/p73 et les protéines TEAD (Kanai et al., 2000; Mahoney et al., 2005). Il a été montré que non seulement les gènes *TAZ* et *TEAD1* avaient des profils d'expression similaires mais aussi que les protéines correspondantes interagissaient *in vitro* et *in vivo* et que cette interaction augmentait l'activité transcritionnelle de TEAD1 (Chan et al., 2009; Mahoney et al., 2005).

La protéine TAZ a un rôle important dans le développement de plusieurs organes comme le poumon, les muscles ou le cœur (Jeong et al., 2010; Mitani et al., 2009; Murakami et al., 2005) (Figure 23). Les souris *TAZ*^{-/-} présentent des défauts de formation du squelette et des atteintes aux reins et aux poumons semblables aux effets de la polykistose rénale et l'emphysème pulmonaire chez l'homme (Makita et al., 2008). Les protéines TAZ et TEAD1 sont aussi impliquées dans de nombreux processus cellulaires, comme la différenciation des cellules souches (Lei et al., 2008).

C. Implication des protéines TEAD et de leurs cofacteurs dans le cancer

1. La protéine TEAD1 et le cancer

Plusieurs travaux suggèrent que la protéine TEAD1 pourrait être impliquée dans la formation des tumeurs de nombreux organes. C'est le cas du cancer du sein qui peut être induit dans le modèle murin par la surexpression du virus MMTV (pour **M**ouse **M**ammary **T**umor **V**irus). Plusieurs sites de fixation pour la protéine TEAD1 sont présents dans la région LTR (pour **L**ong **T**erminal **R**epet) du virus MMTV et des séquences homologues à ces séquences rétrovirales ont été identifiées chez l'homme suggérant une implication d'un virus MMTV-like dans la formation du cancer du sein (Liu et al., 2001). Parmi ces sites de fixation, au moins un a été identifié comme pouvant lier le facteur TEAD1 présent dans des extraits nucléaires de cellules humaines MCF7 (Lignée cancéreuse du sein). La mutation de ce site de fixation de TEAD1 augmente le niveau d'expression du virus MMTV. La surexpression de TEAD1, quant à elle, réprime l'activité basale de la région LTR et inhibe la réponse de cette dernière aux glucocorticoïdes (Maeda et al., 2002c).

La protéine TEAD1 est un marqueur pronostic du cancer de la prostate et son inhibition diminue la capacité de prolifération d'une lignée cellulaire prostatique tumorale et la formation d'acini, suggérant le rôle de TEAD1 dans la croissance tumorale (Knight et al., 2008).

La surexpression de la protéine TEAD1 a été rapportée dans la presque totalité des carcinomes du canal pancréatique et la protéine stimule l'expression du gène de la mésothéline qui est un marqueur diagnostique du cancer du pancréas (Hucl et al., 2007). Des isoformes tronquées de la protéine ont été détectées dans des lignées de cellules pancréatiques de souris transformées par l'antigène T du virus SV40 et ces mêmes isoformes sont présentes dans le pancréas tumoral chez l'homme (Zuzarte et al., 2000). Ceci suggère que le virus pourrait affecter l'épissage du gène *TEAD1* et induire la production d'isoformes de la protéine favorisant la progression tumorale.

2. Implication des cofacteurs des protéines TEAD dans le cancer

a. Les protéines YAP1 et TAZ

Les protéines YAP1 et TAZ sont considérées comme étant des oncogènes et leur expression est augmentée dans plusieurs cancers chez l'homme. Un niveau élevé de la protéine YAP1 a été observé dans les tumeurs du foie et la protéine a été décrite comme un facteur clé de la tumorigenèse hépatique (Xu et al., 2009 ; Zender et al., 2006). Dans environ 15% des cancers ovariens, le niveau d'expression de la protéine YAP1 est supérieur à celui du tissu sain et ceci est corrélé avec un pronostic vital diminué chez les patients atteints du cancer de l'ovaire. Ceci est aussi observé dans le cas du cancer du poumon et dans les carcinomes œsophagiens (Zhang et al., 2011 ; Wang et al., 2010 ; Muramatsu et al., 2011). La protéine YAP1 joue aussi un rôle dans la progression du cancer colorectal (Avruch et al., 2012; Camargo et al., 2007).

La protéine TAZ stimule l'activation de plusieurs gènes qui favorisent la différenciation mésenchymateuse dans des modèles de gliomes (Bhat et al., 2011). Ceci a pour conséquences la perte de polarité des cellules épithéliales, la diminution des jonctions intercellulaires et l'acquisition par ces cellules de propriétés de cellules souches mésenchymateuses. Les tumeurs qui présentent un niveau élevé de la protéine TAZ sont plus invasives et métastatiques et plus difficiles à traiter. La protéine est surexprimée dans environ 20% des cancers du sein chez la femme et joue un rôle dans la migration, l'invasion et la malignité des cellules (Chan et al., 2008).

La formation d'un complexe transcriptionnel entre la protéine YAP1 (ou TAZ) et la protéine TEAD est un prérequis essentiel à la régulation des gènes cibles qui favorisent la tumorigenèse. Les molécules qui perturbent la formation de ce complexe constituent des outils thérapeutiques potentiels pour le traitement des cancers dépendants des oncogènes YAP1/TAZ. Ainsi, la molécule vertéporfine, dérivée de la benzoporphyrine, est capable de modifier la conformation de YAP1 et empêcher son interaction avec TEAD, diminuant par voie de conséquence la prolifération cellulaire induite par l'oncogène (Liu-Chittenden et al., 2012).

	Cancer
Vgll1	++: cancer du sein, cancer de la vessie
Vgll3	++: sarcomes mous - -: cancer de l'ovaire
Vgll4	- -: adénocarcinome pancréatique et pulmonaire

Tableau 7 : Expression des protéines VGLL dans différents cancers chez l'Homme.

Plusieurs études ont établi un lien entre l'expression des gènes VGLL1, VGLL3 et VGLL4 et le développement de certains cancers. ++ : les protéines sont surexprimées dans les cancers ; -- les protéines possèdent des niveaux d'expression plus faible que dans les tissus normaux. Les chiffres entre parenthèses correspondent aux références suivantes : (1) Richardson et al., 2006 ; (2,3) Hélias-Rodzewicz et al., 2010 ; Hallor et al., 2009 ; (4) Cody et al., 2009 ; (5) Mann et al., 2012 ; (6) Zhang et al., 2014.

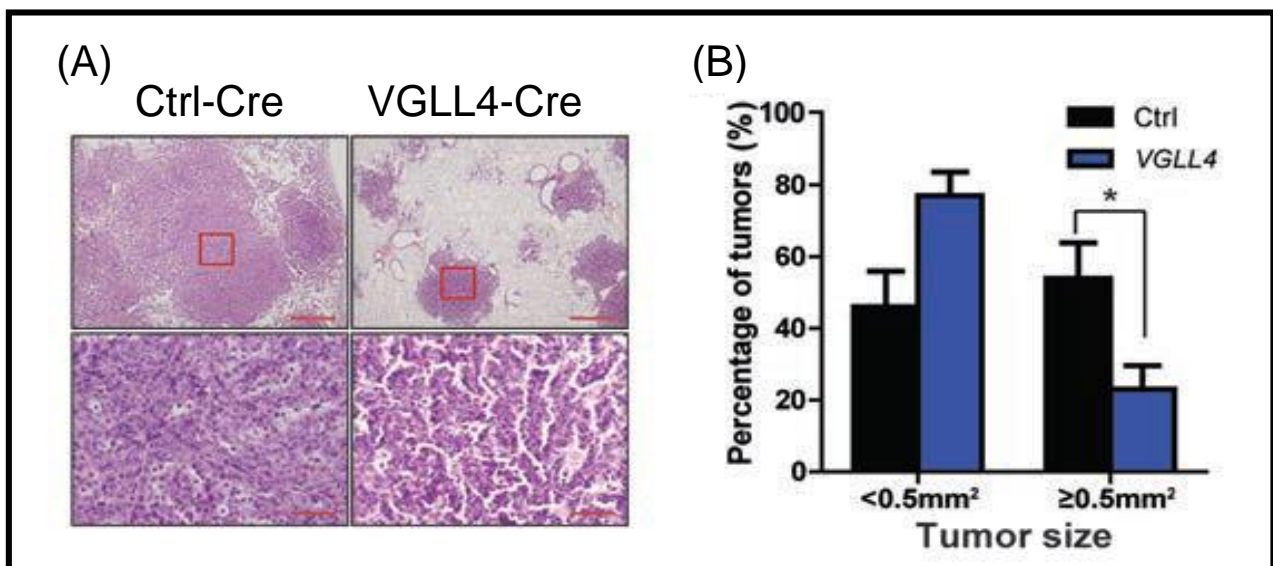


Figure 24 : VGLL4 agit comme suppresseur de tumeur dans les adénocarcinomes pulmonaires.

(A) Les tumeurs exprimant VGLL4 (VGLL4-Cre) sont plus petites que les tumeurs exprimant la construction contrôle (CTRL-Cre).

(B) Représentation graphique du pourcentage des tumeurs selon leur taille. (Zhang et al., 2014).

Les récepteurs couplés aux protéines G ont la capacité d'activer YAP1 et TAZ et des mutations activatrices de ces récepteurs ont été reliées à certains cancers humains (Dorsam and Gutkind, 2007; Mo et al., 2012; Yu et al., 2012a). La possibilité d'utiliser des antagonistes de ces récepteurs pourrait constituer une stratégie pour inhiber l'activité oncogénique des protéines YAP1 et de TAZ.

b. Les protéines vestigial-like

Les protéines vestigial-like sont des cofacteurs connus pour interagir avec les facteurs de transcription TEAD et plusieurs observations ont relié l'expression des gènes correspondants avec le caractère tumoral des cellules (Tableau 7). Le gène *VGLL1* est utilisé comme biomarqueur dans le cancer de la vessie et permet de classer les tumeurs en bon ou mauvais pronostic (Blaveri et al., 2005). Un niveau d'expression élevé du gène a été observé dans les cancers du sein mais il n'y a pas d'évidence quant à sa contribution à la progression tumorale (Richardson et al., 2006). La structure du complexe protéique VGLL1-TEAD est similaire à celle du complexe YAP1-TEAD et la surexpression de la protéine VGLL1 favorise la prolifération cellulaire suggérant que la protéine pourrait jouer un rôle similaire à l'oncogène YAP1 dans les cancers humains (Pobbati et al., 2012).

La protéine VGLL3 favorise la progression des sarcomes des tissus mous et le développement des sarcomes fibroblastiques myxoinflammatoires (Hallor et al., 2009; Helias-Rodzewicz et al., 2010). D'autres travaux ont cependant rapporté que le gène *VGLL3* pourrait être suppresseur de tumeur dans le cas du cancer ovarien (Cody et al., 2009).

Les résultats les plus marquants à ce jour concernent la protéine VGLL4 qui a un rôle suppresseur de tumeur *via* la régulation de la voie de signalisation Hippo. Le gène *VGLL4* a été identifié comme un des gènes mutés dans l'adénocarcinome pancréatique et il est associé de manière significative avec un mauvais pronostic des patients (Mann et al., 2012). Une étude récente indique qu'il possède une fonction suppresseur de tumeur dans l'adénocarcinome pulmonaire (Zhang et al., 2014b). En effet, il est sous-exprimé dans l'adénocarcinome pulmonaire chez l'homme ainsi que chez la souris par rapport au tissu sain et sa surexpression permet de bloquer la progression tumorale *in vitro* et *in vivo* (Figure 24) (Zhang et al., 2014b).

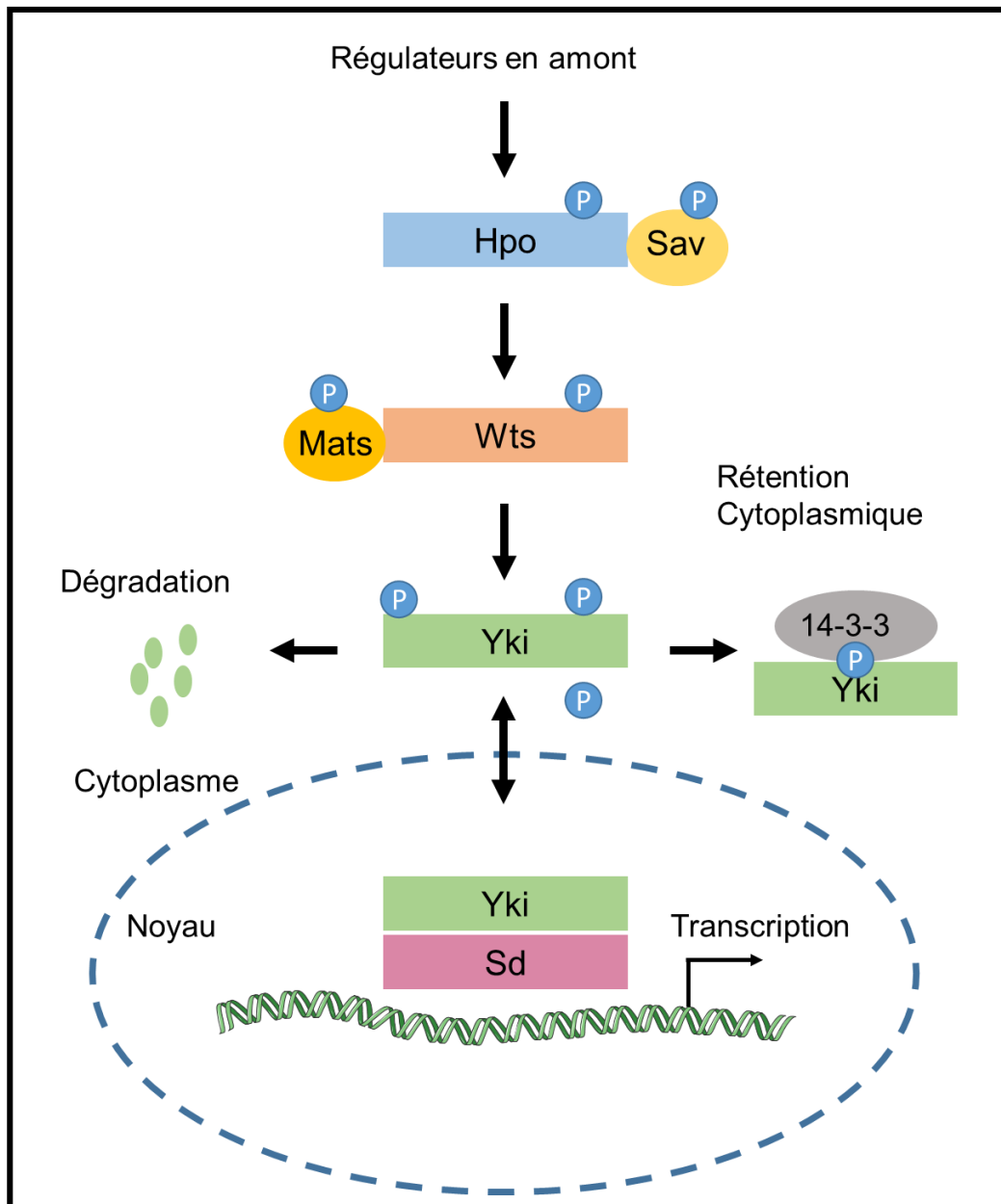


Figure 25 : La voie de signalisation Hippo chez la drosophile.

La protéine Hippo (Hpo) interagit avec la protéine Salvador (Sav) qui doit être phosphorylée pour être active. La protéine Hpo phosphoryle la protéine Warts (Wts) qui interagit avec Mats et phosphoryle Yorkie (Yki). La protéine Yki phosphorylée est dégradée dans le cytoplasme par le complexe 14-3-3. En absence de phosphorylation, la protéine Yki s'accumule dans le noyau où elle se complexe avec le facteur de transcription Scalloped (Sd) pour activer la transcription de gènes cibles.

III. La voie de signalisation Hippo

Le contrôle du nombre de cellules est crucial pour le développement animal et l'homéostasie tissulaire et sa dérégulation peut aboutir à la formation de tumeurs ou la dégénérescence des organes. Une des voies de signalisation majeure qui contrôle la croissance des organes est la voie Hippo. Cette voie a été découverte chez la drosophile lors d'études visant à identifier des gènes impliqués dans la croissance tissulaire. La voie est très conservée chez les mammifères et regroupe plusieurs gènes suppresseurs de tumeur et oncogènes qui régulent différents processus cellulaires tels que la prolifération, l'adhésion, l'apoptose, la différenciation et la croissance.

Plusieurs éléments de régulation se situant en amont de la voie Hippo ont été décrits mais les connaissances actuelles sur leur mode de fonctionnement restent incomplètes. Cependant, il est clair que la voie signalisation fonctionne comme un réseau qui intègre de multiples entrées en amont, plutôt que comme une voie linéaire simple.

A. La voie Hippo chez la drosophile

La voie Hippo a particulièrement été bien caractérisée chez la drosophile grâce à sa puissance comme modèle génétique (Figure 25). La protéine Warts (ou Wts) a été la première protéine de la voie Hippo identifiée lors d'un crible génétique effectué chez la drosophile visant à caractériser des gènes dont la perte de fonction conduisait à une forte prolifération cellulaire. Warts est une protéine Serine/Thréonine kinase, et la perte de fonction du gène *wts* entraîne des excroissances dans différentes structures épithéliales telles que l'œil, l'aile ou encore la patte (Justice et al., 1995; Xu et al., 1995b). En 2002, la protéine Salvador (ou Sav) a été identifiée et la perte de fonction du gène *sav* induit une diminution de l'expression du gène *cycline E* et du gène *diap1* qui code une protéine anti apoptotique (Tapon et al., 2002). La protéine Sav possède un domaine WW qui lui permet d'interagir avec Wts. La perte de fonction des gènes *wts* ou *sav* stimule la prolifération cellulaire et inhibe l'apoptose (Tapon et al., 2002).

Par la suite, plusieurs études ont identifié la protéine Hippo (ou Hpo) comme un composant de la voie de signalisation en amont de Wts (Basu et al., 2003; Harvey et al., 2003; Pantalacci et al., 2003; Udan et al., 2003; Wu et al., 2003).

La protéine Hpo est une protéine Serine/Thréonine kinase comme Wts et l'inactivation du gène *hpo* se caractérise par des phénotypes similaires à la perte de fonction de *wts* ou *sav*. Des expériences *in vitro* et en culture cellulaire ont montré que Hpo s'associait physiquement avec Wts et l'activait par phosphorylation. La protéine Sav est une protéine adaptatrice qui pour être active doit être phosphorylée, elle-même étant capable d'autophosphorylation (Colombani et al., 2006; Pantalacci et al., 2003; Wu et al., 2003). En 2005, la protéine Mats (pour **Mob As Tumor Supressor**) a été identifiée comme un autre composant de la voie Hippo. La protéine est capable de se lier à la protéine Wts et stimuler son activité kinase (Colombani et al., 2006; Lai et al., 2005; Pantalacci et al., 2003; Wu et al., 2003). La perte de fonction du gène *mats* donne naissance à des phénotypes qui ressemblent fortement à ceux causés par la perte de fonction de *hpo*, *sav* et *wts* confirmant l'implication de Mats dans la voie Hippo.

La voie Hippo affecte le niveau d'expression du gène *diap1* suggérant qu'il existe un facteur de transcription qui agit comme effecteur nucléaire de cette voie (Udan et al., 2003; Wu et al., 2003). Cet effecteur a été identifié comme étant la protéine Yorkie (ou Yki) (Huang et al., 2005). La protéine Yki a été isolée lors d'un crible double hybride visant à identifier les protéines capables d'interagir physiquement avec la protéine Wts.

La protéine Yki est capable d'induire l'expression des gènes *cycline E* et *diap1* mais cependant elle ne possède pas de domaine de liaison à l'ADN. La protéine Scalloped (ou Sd) constitue le facteur de transcription avec lequel se complexe Yki pour réguler les gènes cibles (Bandura and Edgar, 2008; Goulev et al., 2008; Wu et al., 2008; Zhang et al., 2008). Lorsque la voie Hippo est active, la protéine Yki est phosphorylée par la protéine Wts et séquestrée dans le cytoplasme puis dégradée par le protéasome. Lorsque un ou des composants de la voie Hippo en amont de Yki sont inactifs, alors la protéine s'accumule dans le noyau, forme un complexe avec la protéine Sd et active la transcription des gènes cibles (Figure 25). Ainsi la fonction principale de la voie Hippo est d'inhiber la fonction de YAP1 dans le noyau.

Plusieurs travaux ont apporté des éclaircissements importants quant au fonctionnement de la voie, en amont et en aval de la protéine Hpo.

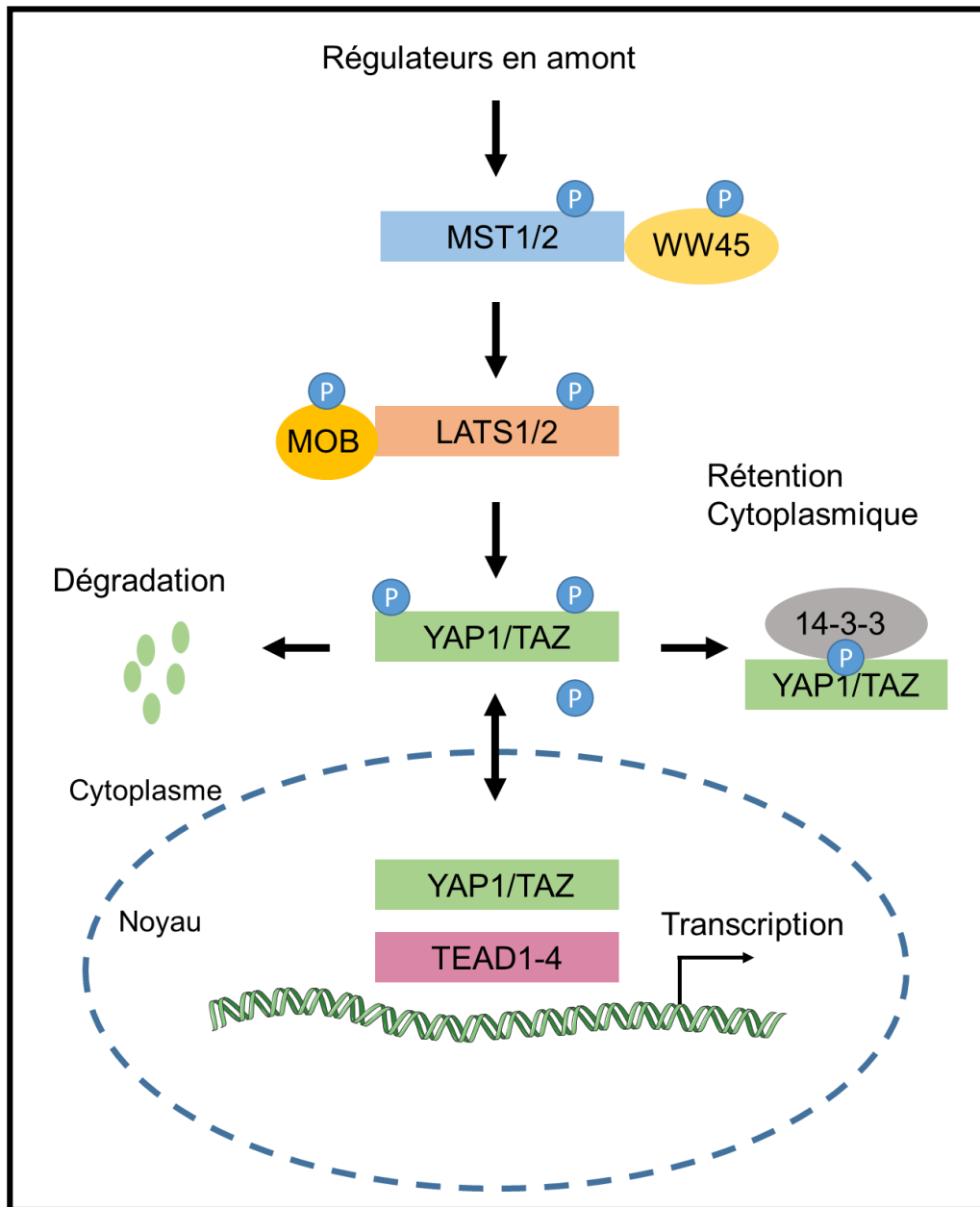


Figure 26 : La voie de signalisation Hippo chez les mammifères.

Tous les composants de la voie Hippo de drosophile possèdent des orthologues chez les mammifères. Les protéines MST1/2 (orthologues de la protéine Hippo) sont situées en amont de la voie de signalisation. Elles phosphorylent la protéine Salvador (WW45), les protéines LATS1/2 (orthologues de la protéine Wts) et la protéine MOB (orthologue de la protéine Mats). Les protéines LATS1/2 se lient à MOB et vont phosphoryler les effecteurs YAP1/TAZ pour les inactiver. Comme chez la drosophile, quand les protéines YAP1/TAZ ne sont pas phosphorylées, elles s'accumulent dans le noyau et se complexent avec les facteurs de transcription TEAD1 à 4 (orthologues de Scalloped) pour activer la transcription de gènes cibles.

Les protéines Merlin (Mer) et Expanded (Ex) agissent en amont de Hpo et ont été caractérisées comme nécessaires à la phosphorylation de Wts et à l'activation de la voie (Hamaratoglu et al., 2006). Ces protéines font partie de la famille des protéines à domaine FERM (**F** pour protein 4.1, **E** pour erzin, **R** pour radixin et **M** pour moesin) et sont localisées au niveau des jonctions adhérentes dans la membrane apicale des cellules épithéliales (McCartney et al., 2000). La protéine Fat (Ft) a aussi été décrite comme un composant qui agit en amont de la protéine Hpo dans la voie. Le gène *Fat* est l'un des premiers gènes suppresseurs de tumeur identifié chez la drosophile et code une protéine membranaire de type protocadherine (Bennett and Harvey, 2006; Cho et al., 2006; Mahoney et al., 1991; Silva et al., 2006; Willecke et al., 2006). La protéine Fat serait requise pour stabiliser et localiser la protéine Ex mais aussi agir positivement sur la stabilité de la protéine Wts en aval de Hpo (Cho et al., 2006).

B. La voie Hippo chez les mammifères

Les composants de la voie Hippo identifiés chez la drosophile ont tous des homologues chez les mammifères. Les protéines Hippo, Salvador, Warts, Mats et Yorkie ont pour homologues chez l'homme respectivement MST1/2, WW45, LATS1/2, MOB1 et YAP1/TAZ (Figure 26). La conservation fonctionnelle entre les protéines de mammifères et les protéines de drosophile a été établie par des expériences de sauvetage. Ainsi les protéines LATS1/2, MST2 et MOB1 sont capables de sauver les phénotypes mutants correspondants chez la drosophile (Harvey and Tapon, 2007; Pan, 2007; Saucedo and Edgar, 2007).

Les protéines MST1 et MST2 (pour **M**ammalian **Ste**20-like Protein Kinase **1** et **2**), homologues de la protéine Hpo, appartiennent à la famille des protéines STE20 (pour **S**terile**20**) caractérisée par la présence d'un domaine Ser/Thr kinase conservé dans leur région N-terminale et une région C-terminale avec un domaine coiled-coil de dimérisation. L'autophosphorylation de la kinase MST1 humaine nécessite la dimérisation de la protéine (Glantschnig et al., 2002; Praskova et al., 2004). La plupart des études réalisées sur MTS1/2 concernent sa fonction dans l'apoptose.

Il a été démontré que les protéines MST1/2 colocalisaient partiellement avec le cytosquelette d'actine qui, lorsqu'il est perturbé, peut entraîner l'activation des deux protéines (Densham et al., 2009). Le double knock-out de MST1/2 dans le foie de souris entraîne une diminution du niveau de phosphorylation de la protéine YAP1 et induit une hypertrophie de l'organe, phénotype comparable à la surexpression de la protéine (Lu et al., 2010; Song et al., 2010; Zhou et al., 2009). En revanche, les conséquences de la perte de fonction de MST1/2 sur la taille des organes dépendent de l'organe considéré et sont plus marquées dans le foie et l'estomac que dans le rein (Song et al., 2010). Ceci suggère que les fonctions de MST1/2 dans la voie Hippo dépendent du contexte cellulaire. De la même façon que leurs homologues de drosophile, les protéines MST1/2 peuvent phosphoryler les protéines LATS1/2 ainsi que les protéines adaptatrices WW45 et MOB1 (Callus et al., 2006; Chan et al., 2005; Dong et al., 2007; Praskova et al., 2008).

Les protéines WW45 (pour **WW** domain-containing protein **45**-kDa molecular mass), homologues de la protéine Salvador, contiennent deux domaines WW permettant l'interaction avec les motifs PY présents sur certaines protéines comme les protéines LATS1/2. Chez les mammifères, WW45 interagit avec MST1/2 et cette interaction permet la phosphorylation de WW45 par MST1/2 (Callus et al., 2006). Chez la souris, la délétion homozygote du gène *WW45* est létale. En revanche, les souris hétérozygotes forment des tumeurs et le KO conditionnel du gène dans le foie conduit à une hépatomégalie et à la formation de tumeurs (Lee et al., 2010). Cependant, la phosphorylation des protéines LATS1/2 et de YAP1 n'est pas affectée dans ces souris, suggérant que la protéine WW45 n'est pas totalement nécessaire pour l'activation de la voie Hippo et qu'elle peut limiter la croissance du foie par d'autres mécanismes (Lee et al., 2008).

Les protéines LATS1/2 (pour **L**arge **T**umor **S**uppressor kinases), homologues de la protéine Warts, sont des protéines à activité serine/thréonine kinase qui font partie de la famille de kinases NDR (pour **N**uclear **D**bf2-**R**elated Kinases) (Justice et al., 1995; Xu et al., 1995b). Elles possèdent des motifs PY permettant l'interaction avec les protéines à domaines WW et un domaine UBA (pour **U**biquitine-**A**ssociated motif) en position N-terminale impliqué dans les processus d'ubiquitination des protéines. Lorsque la voie de signalisation Hippo est active, la protéine MST1/2 phosphoryle la

protéine LATS1/2 qui phosphoryle en cascade la protéine YAP1/TAZ créant ainsi une boucle de phosphorylation (Chan et al., 2005; Lei et al., 2008; Zhao et al., 2007; Zhao et al., 2008a). Les travaux ont montré que la phosphorylation de YAP1 pouvait être dépendante du type cellulaire. Ainsi, dans les cellules épithéliales humaines (cellules MCF10A), la surexpression de la protéine LATS1, mais pas celle de LATS2, inhibe la transition épithélio-mésenchymateuse, dépendante de la protéine YAP1 en induisant sa phosphorylation et sa rétention cytoplasmique (Zhang et al., 2008). Au contraire, dans les fibroblastes embryonnaires de souris, la phosphorylation de YAP1 n'est pas affectée (Lian et al., 2010; Zhao et al., 2010). Les souris KO pour le gène *LATS1* développent des sarcomes des tissus mous et des tumeurs de l'ovaire, alors que les souris KO pour le gène *LATS2* ne sont pas viables (McPherson et al., 2004; Yabuta et al., 2007).

Les protéines MOB1 (MOBKL1A/MOBKL1B), homologues de la protéine Mats, sont de petites protéines constituées d'un domaine MOB1 impliqué dans les interactions protéine-protéine. Les protéines MOBKL1A/MOBKL1B sont phosphorylées par les protéines MST1/2, ce qui accroît leur interaction avec les protéines LATS1/2 et l'activation de ces dernières selon un mécanisme qui demeure inconnu (Chow et al., 2010; Praskova et al., 2008). Si l'on provoque artificiellement la relocalisation de la protéine MOBKL1A/MOBKL1B à la membrane plasmique, il y a activation et la relocalisation de la protéine LATS1 à la membrane et une inhibition de la prolifération cellulaire (Hergovich et al., 2006). Contrairement à la drosophile, la localisation à la membrane des protéines MOBKL1A/MOBKL1B chez les mammifères n'a pas été confirmée dans un contexte normal.

Les protéines YAP1 et TAZ, ont été décrites comme étant inhibées par la cascade de phosphorylation médiée par les protéines MST1/2 et LATS1/2, confirmant la conservation de la voie Hippo chez les mammifères (Dong et al., 2007; Lei et al., 2008; Sudol et al., 1995a; Zhang et al., 2008; Zhao et al., 2007). De la même façon que chez la drosophile, la phosphorylation de la protéine YAP1 ou TAZ par la protéine LATS1/2 entraîne sa séquestration dans le cytoplasme et son inactivation *via* la protéine 14-3-3. Tout comme la protéine Yorkie, YAP1 et TAZ ne possèdent pas de domaine de liaison à l'ADN et leur activité transcriptionnelle repose sur leur interaction avec des facteurs de transcription pouvant se lier à l'ADN.

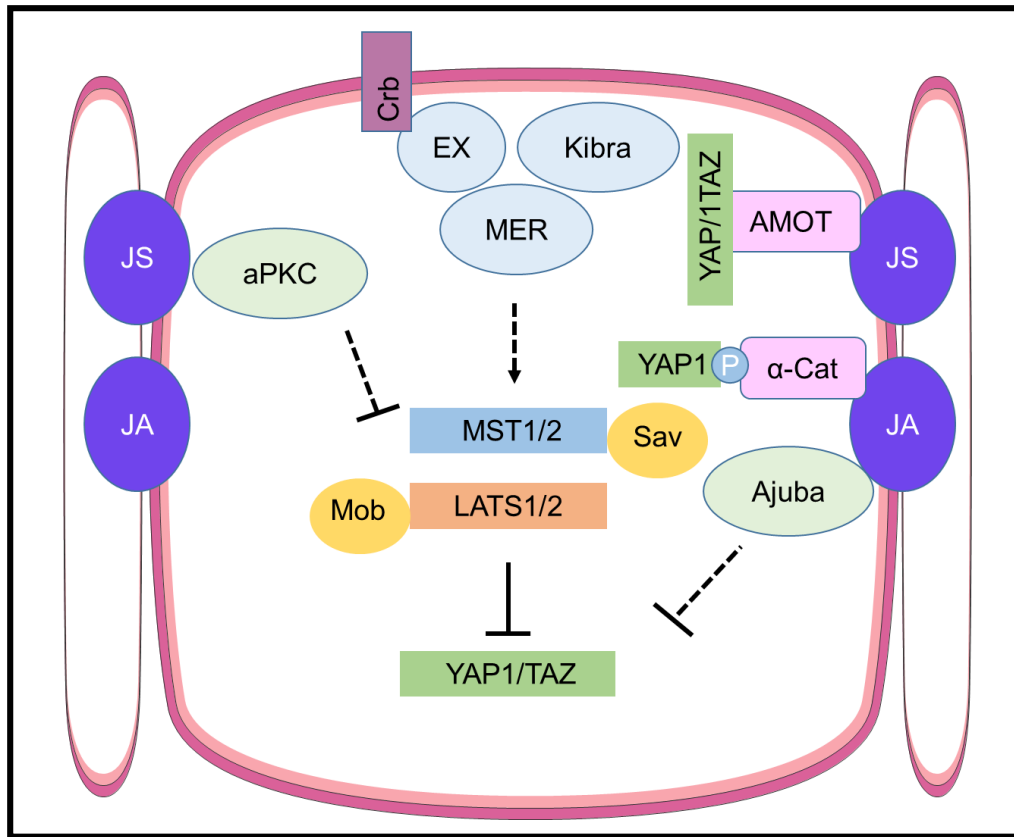


Figure 27 : La régulation de la voie Hippo et la polarité apico-basale.

La protéine Crumbs (Crb) est localisée dans la membrane plasmique subapicale et interagit avec la protéine Expanded (EX) qui elle-même interagit avec protéines Merlin (MER) et Kibra. Ces trois protéines activent les protéines de la voie Hippo. La protéine AMOT, située au niveau des jonctions serrées (JS) recrute les protéines YAP1/TAZ et empêche leur localisation nucléaire. Les protéines de jonctions adhérentes (JA) jouent également un rôle dans la polarité. La protéine α -caténine peut inhiber l'activité de la protéine YAP1. Les extrémités fléchées ou coupées indiquent une activation ou une inhibition respectivement, les flèches en pointillées indiquent des mécanismes indirects ou inconnus. (Adapté de Yu and Guan, 2015).

Différents facteurs de transcription ont été décrits comme étant capables de se lier à YAP1 ou TAZ tels que les protéines TEAD, RUNX (pour **RUNT** related transcription factor), ERBB-4 (pour V-**ERB**-A erythroblastic leukemia viral oncogene homolog-4) et p73 (Strano et al., 2001, Vassilev et al., 2001, Yagi et al., 1999). Les protéines TEAD, orthologues de Scalloped de drosophile, sont considérées comme les partenaires principaux de YAP1 et TAZ et sont indispensables à leurs fonctions biologiques (Chan et al., 2009; Zhang et al., 2009; Zhao et al., 2010; Zhao et al., 2008a).

C. Régulation de la voie Hippo

La voie Hippo est impliquée dans de très nombreux processus cellulaires. Les travaux récents ont commencé à identifier plusieurs facteurs qui agissent en amont de la voie Hippo comme la polarité cellulaire, la mécanotransduction ou encore la signalisation *via* les récepteurs couplés aux protéines G (ou GPCR). Le cytosquelette d'actine ainsi que les tensions cellulaires qui opèrent entre cellules et au sein des tissus apparaissent aussi comme des médiateurs importants qui intègrent et transmettent des signaux en amont du cœur de la signalisation Hippo à savoir des kinases Hippo (ou MST1/2) et Warts (ou LATS1/2).

1. La régulation de la polarité apico-basale

Les cellules épithéliales adhèrent les unes aux autres à travers des jonctions cellulaires telles que les jonctions adhérentes ou les jonctions serrées. Plusieurs régulateurs qui agissent en amont de la voie Hippo sont connus pour être des composants de ces jonctions ou des protéines impliquées dans la polarité apico-basale (Figure 27). Les premiers régulateurs en amont de la voie Hippo mis en évidence ont été les protéines Merlin et Expanded qui contiennent un domaine FERM (Hamaratoglu et al., 2006). La protéine Expanded a été identifiée chez la drosophile comme suppresseur de tumeur alors que la protéine Merlin a été initialement identifiée comme suppresseur de tumeur chez l'homme (Boedigheimer et al., 1997; Gusella et al., 1996). Les deux protéines agissent ensemble pour réguler la prolifération et la

différenciation cellulaires (McCartney et al., 2000). Par la suite, Kibra, protéine à domaines WW et C2, a été décrite comme interagissant avec Merlin et Expanded, et le complexe formé par les trois protéines se colocalise au domaine apical des cellules épithéliales et peut activer Warts de manière coopérative (Baumgartner et al., 2010; Boedigheimer et al., 1997; Genevet et al., 2010; Yu et al., 2010). Les protéines Salvador et Hippo peuvent s'associer physiquement aux protéines Merlin et par ailleurs Expanded et Kibra peuvent interagir avec la protéine Warts, suggérant que le complexe Mer/Ex/Kibra pourrait recruter les kinases de la voie Hippo au niveau apical de la membrane plasmique (Genevet et al., 2010; Yu et al., 2010). La protéine Crumbs (ou Crb) est localisée au niveau de la membrane plasmique subapicale et joue un rôle important dans la polarité apico-basale. Elle a été identifiée chez la drosophile comme un régulateur de surface cellulaire pour la voie Hippo (Chen et al., 2010a; Grzeschik et al., 2010; Robinson et al., 2010; Tepass et al., 1990). La protéine contient dans son domaine intracellulaire un motif de liaison lui permettant de se lier au domaine FERM de la protéine Expanded qui peut réguler alors l'activité des kinases de la voie Hippo (Chen et al., 2010a; Ling et al., 2010; Robinson et al., 2010).

D'autres régulateurs de la polarité apico-basale ont été décrits tels que le complexe Par. Ce complexe contient différents composants comme la protéine aPKC (pour **a**typica **P**rotein **K**inase **C**) qui peut induire l'expression de la protéine Yki et la croissance cellulaire (Grzeschik et al., 2010; Sun and Irvine, 2011). La régulation de la polarité apico-basale est très conservée chez les mammifères et NF2, l'homologue de Merlin, est une protéine suppresseur de tumeur dont les mutations entraînent des tumeurs du cerveau non malignes (syndrome neurofibromatose de type 2). Chez la souris, le knock-out conditionnel du gène dans le foie induit un hépatocarcinome dont la formation peut être bloquée dans les souris hémizygotes pour le gène *YAP1* (Benhamouche et al., 2010; Zhang et al., 2010). La perturbation des jonctions adhérentes et serrées dans les cellules de mammifères en culture induit la localisation des protéines YAP1/TAZ dans le noyau et l'expression de leurs gènes cibles (Varelas et al., 2010). Plusieurs protéines des jonctions cellulaires de cellules mammifères ont été identifiées comme des régulateurs ou comme des partenaires de composants de la voie Hippo. Ainsi, l'angiomotine (ou AMOT), protéine absente chez la drosophile, possède un motif PPxY qui lui permet d'interagir avec le domaine WW des protéines YAP1/TAZ (Chan et al., 2011b; Wang et al., 2011; Zhao et al., 2011).

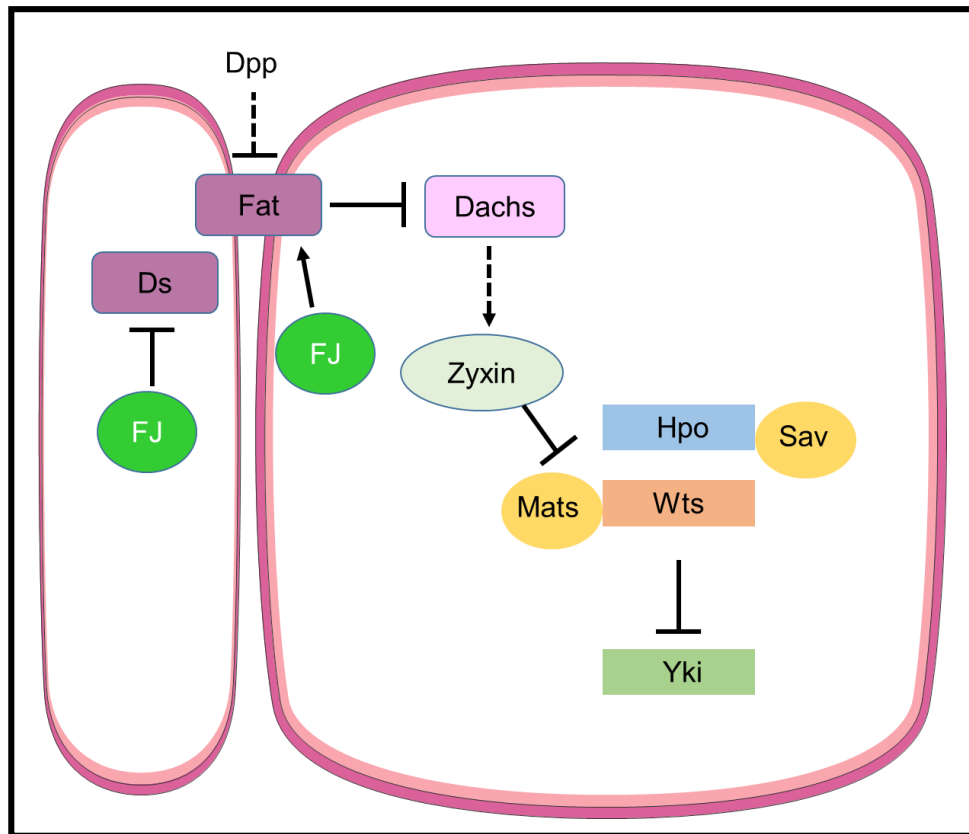


Figure 28 : La régulation de la voie Hippo et la polarité cellulaire planaire.

Les cadhérines Fat et Dachous (Ds) forment un dimère intercellulaire. Cette dimérisation est médiée par la protéine Four-jointed (FJ). Quand l'activité de FJ est inhibée, la protéine Dachs est localisée dans la région subapicale et entraîne l'interaction entre les protéines Zyxine et Warts (Wts), induisant la dégradation de Warts. La voie de polarité cellulaire planaire peut être modulée par différents facteurs extracellulaires tels que Dpp. Les extrémités fléchées ou coupées indiquent une activation ou une inhibition respectivement, les flèches en pointillées indiquent des mécanismes indirects ou inconnus. (D'après Yu and Guan, 2015).

Les protéines AMOT recrutent les protéines YAP1/TAZ au niveau des jonctions serrées ou du cytosquelette d'actine entraînant une diminution de leur activité au niveau nucléaire (Zhao et al., 2011). De plus, ces protéines sont capables de phosphoryler les protéines YAP1/TAZ au niveau des sites ciblés par les protéines LATS (Zhao et al., 2011). La protéine α -caténine est un composant des jonctions adhérentes et peut inhiber l'activité de l'oncogène YAP1, contribuant ainsi à son rôle suppresseur de tumeur (Schlegelmilch et al., 2011; Silvis et al., 2011). D'autres protéines importantes pour l'établissement ou le maintien de la polarité apico-basale peuvent moduler la voie Hippo. La protéine Ajuba peut interagir avec les protéines kinases WW45 et LATS dans les cellules de mammifères ou de drosophile et agir comme inhibiteur de l'activité transcriptionnelle des protéines YAP1/Yki (Das Thakur et al., 2010).

L'ensemble de ces travaux démontrent que les contacts cellule-cellule, l'intégrité des jonctions cellulaires et la polarité apico-basale sont des acteurs importants dans la régulation de la voie Hippo.

2. La polarité cellulaire planaire

Les cellules épithéliales sont également polarisées selon un axe perpendiculaire à l'axe apico-basal, dans lequel les cellules sont alignées et orientées dans la même direction de manière coordonnée (Simons and Mlodzik, 2008). Cette polarisation est appelée polarité cellulaire planaire (ou PCP pour **P**lanar **C**ell **P**olarity). Deux réseaux de gènes distincts ont un rôle critique dans la régulation de la polarité cellulaire planaire : Frizzled/Flamingo (ou Fz/Fmi) et Fat/Dachsous (ou Ft/Ds) (Simons and Mlodzik, 2008), ce dernier est impliqué dans la régulation de la voie Hippo chez la drosophile (Figure 28). Les protéines Ft et Ds sont deux cadhérines atypiques qui forment des dimères intercellulaires et cette dimérisation est régulée par une phosphorylation médiée par la protéine Four-jointed (FJ) (Cho and Irvine, 2004; Ishikawa et al., 2008; Matakatsu and Blair, 2004). Chez la drosophile, la protéine Ft est un suppresseur de tumeur et sa perte de fonction induit l'activation de la protéine Yki *via* l'inactivation des protéines Ex ou Wts (Bennett and Harvey, 2006; Cho et al., 2006; Feng and Irvine, 2007; Silva et al., 2006; Tyler and Baker, 2007; Willecke et al., 2006).

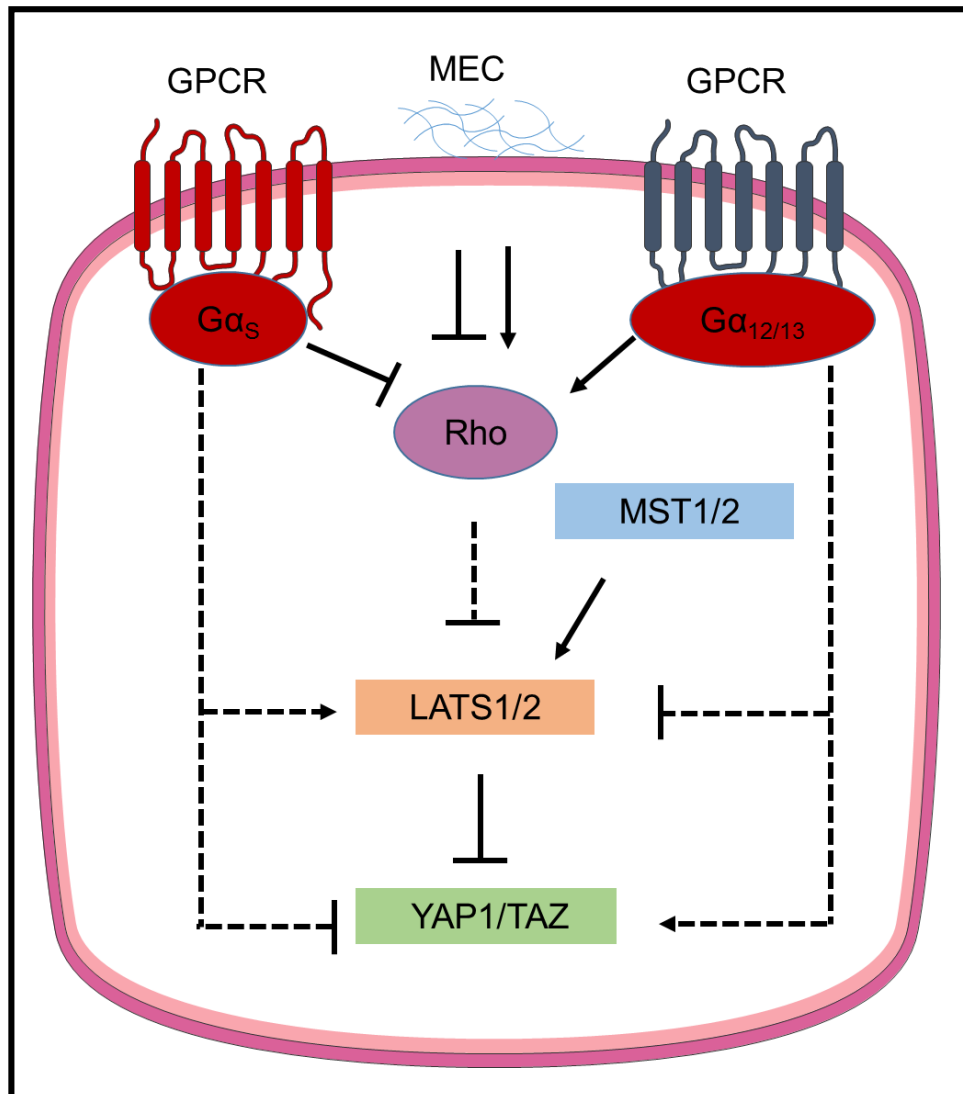


Figure 29 : La régulation de la voie Hippo par les récepteurs couplés aux protéines G.

Des protéines vont se fixer aux récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs) qui vont à leur tour activer ou inhiber des Rho GTPases (Rho). Les Rho GTPases vont quant à elles activer YAP1. Les extrémités fléchées ou coupées indique une activation ou une inhibition respectivement, les flèches en pointillées indiquent des mécanismes indirects ou inconnus. (D'après Yu and Guan, 2015).

Un gradient élevé de concentration de la protéine Ds peut inhiber l'activité de Ft, ce qui entraîne la localisation de la myosine atypique Dachs dans la région subapicale de la cellule (Cho et al., 2006; Feng and Irvine, 2007). Dachs favorise alors l'interaction entre les protéines Zyxine et Wts, ce qui en cascade induit la dégradation de Wts (Rauskolb et al., 2011). L'effet du système Ft/Ds sur la voie Hippo peut être modulé par différents morphogènes comme Dpp (ou decapentaplegic; homologue de BMP) et Wingless (homologue de Wnt) (Rogulja et al., 2008; Zecca and Struhl, 2010). La protéine Four-jointed peut être sécrétée et fonctionner comme un morphogène pour réguler la phosphorylation de Ft/Ds (Ishikawa et al., 2008; Tagliabracci et al., 2012) (Figure 28). Chez les mammifères, nos connaissances sur les relations entre le système PCP Ft/Ds et la voie Hippo sont encore partielles. Il existe chez les mammifères deux protéines orthologues de la protéine Ds (DCHS1/2) et quatre protéines orthologues de la protéine Fat (FAT1-4), parmi lesquelles, seule la protéine FAT4 présente une homologie significative avec la protéine de drosophile. Le rôle du système PCP Fz/Fmi sur la voie Hippo est moins bien compris. La surexpression de Frizzled 4 peut activer la protéine YAP1 et Wnt peut activer la protéine TAZ dans les cellules de mammifères, suggérant que le système Fz/Fmi peut aussi réguler la voie Hippo (Azzolin et al., 2012; Huang et al., 2012; Yu et al., 2012b).

3. Les récepteurs couplés aux protéines G

De nombreux facteurs de croissance régulent la prolifération cellulaire en activant des récepteurs membranaires entraînant tout une cascade de signaux intracellulaires. Il a été postulé que la protéine YAP1, l'effecteur de la voie Hippo, pouvait être régulée par les facteurs de croissance. Deux groupes de recherche ont montré indépendamment que le sérum pouvait activer rapidement la protéine dans les cellules en culture. L'analyse biochimique a révélé que deux composants majeurs du sérum, l'acide lisophosphatidique (ou LPA) et la sphingosine-1-phosphate (ou S1P), se liaient à leurs récepteurs de type GPCRs (pour **G** Protein–**C**oupled **R**eceptor) pour activer la protéine YAP1 via les protéines Rho GTPases (Miller et al., 2012; Yu et al., 2012a) (Figure 29). Les récepteurs GPCRs activent les voies de signalisation en aval *via* les protéines hétérotrimériques G. Les signaux couplés aux protéines $G_{\alpha_{12/13}}$, $G_{\alpha_{q/11}}$ ou $G_{\alpha_{i/o}}$ stimulent l'activité de la protéine YAP1 alors que les signaux couplés

aux protéines $G\alpha_s$ répriment son activité. Les mécanismes de transmission des signaux entre les protéines G et la voie Hippo ne sont pas totalement élucidés. La voie Hippo pourrait donc médier de nombreuses fonctions biologiques en aval des GPCRs, en particulier la prolifération cellulaire, la survie cellulaire et la croissance tissulaire (Yu et al., 2012b).

4. La matrice extracellulaire et le cytosquelette

Dans leur environnement naturel, les cellules sont soumises à de très nombreux signaux mécaniques qui proviennent des cellules voisines, de la matrice extracellulaire (MEC) et des fluides biologiques environnants. Les cellules sont capables de « sentir » et de s'adapter à ces signaux mécaniques lors des processus de prolifération, différenciation, apoptose et migration grâce au cytosquelette qui peut répondre aux différents signaux mécaniques et les intégrer (Vogel and Sheetz, 2006). Les filaments d'actine (ou F-actine) sont considérés comme d'importants régulateurs de la prolifération cellulaire et les microtubules sont essentiels à la division cellulaire (Provenzano and Keely, 2011; Sorger et al., 1997). Les microtubules et les filaments d'actine sont des acteurs importants du développement du cancer et constituent des cibles potentielles pour les thérapies (Jordan and Wilson, 1998). Plusieurs études récentes ont montré que la protéine YAP1 était régulée par les signaux mécaniques dans les cellules de mammifères et sensible à la géométrie de cellules (Dupont et al., 2011; Wada et al., 2011; Zhao et al., 2012). Ainsi, la protéine est active dans les cellules qui présentent un étalement alors qu'elle est inactive dans les cellules rondes et compactes (Dupont et al., 2011; Wada et al., 2011). L'adhésion et le détachement des cellules peuvent induire ou réprimer l'activité de la protéine YAP1, respectivement. L'anoikis, qui correspond à la mort des cellules induite par leur détachement, est corrélée à l'inhibition de YAP1 (Zhao et al., 2012). Les études ont montré que le réarrangement du cytosquelette d'actine, en réponse aux différents signaux mécaniques, est associé à des changements de l'activité de la protéine YAP1. Les microtubules peuvent aussi réguler la phosphorylation de la protéine et l'ensemble de ces résultats suggère que la voie Hippo peut être régulée par les différents constituants du cytosquelette (Zhao et al., 2012). Les travaux chez la drosophile ont révélé un lien

entre le cytosquelette d'actine et la voie Hippo (Fernandez et al., 2011; Sansores-Garcia et al., 2011). La déplétion d'une protéine de coiffage de l'actine, qui inhibe la polymérisation de l'actine, entraîne l'activation de la protéine Yki et une excroissance tissulaire. La surexpression de Wts mais pas celle d'Ex ou Hpo peut abolir ce phénotype de manière significative, indiquant que l'effet de l'actine sur l'activité de la protéine Yki est médiée par Wts. Chez les souris KO pour la protéine destrine (facteur dépolymérisant de l'actine) la polymérisation de l'actine est accrue ainsi que la prolifération des cellules épithéliales de la cornée, suggérant que le rôle des filaments d'actine dans la régulation de la protéine YAP1 est conservé chez les mammifères (Ikeda et al., 2003).

Comment le cytosquelette d'actine transmet des signaux en amont de la voie Hippo est encore une énigme. Les protéines MST1/2 et Lats1 peuvent être colocalisées avec les filaments d'actine, ce qui suppose que l'actine pourrait réguler directement l'activité des protéines kinases de la voie Hippo (Densham et al., 2009; Visser-Grieve et al., 2011). L'activité des protéines LATS1/2, mais pas celle des protéines MST1/2, est sensible aux récepteurs GPCRs dans les cellules de mammifères. Ceci suggère que les protéines MST1/2 ne sont pas des cibles directes de ces signaux (Mo et al., 2012; Yu et al., 2012b; Zhao et al., 2012).

Le rôle des filaments d'actine dans la régulation de la voie Hippo pourrait être indirect. Dans cette hypothèse, l'actine pourrait agir alors comme une plateforme et faciliter la transmission du signal entre les régulateurs en amont et les composants du cœur de la voie Hippo. Les protéines kinases ou phosphatases en aval des protéines G et les Rho GTPases peuvent réguler les composants de la voie Hippo de manière dépendante à l'actine. La voie Hippo est donc régulée par un ensemble de signaux dont l'élément commun est le réseau d'actine. L'intégration de ces signaux en amont de la voie Hippo pourrait expliquer la variation de l'activité de la protéine YAP1 qui est sous la dépendance de l'état des cellules et leur environnement.

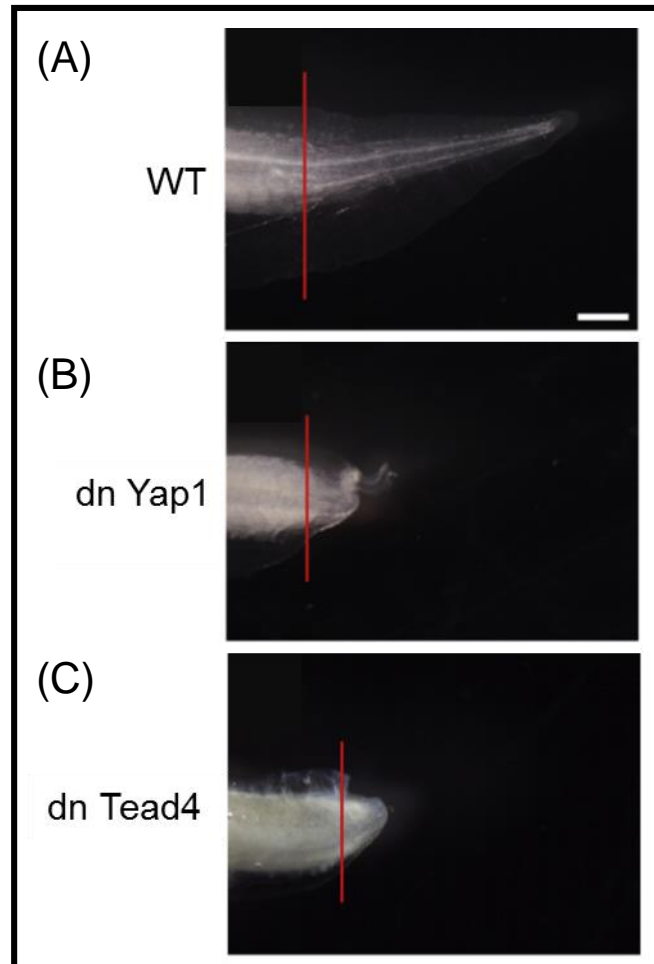


Figure 30 : La voie Hippo est impliquée dans la régénération tissulaire.

Chez le xénope, la voie Hippo est impliquée dans la régénération de la queue.

(A) Les embryons sauvage (WT) présentent une régénération de la queue 7 jours après amputation.

(B) Les embryons ayant une protéine dominante négative YPA1 (dnYAP1) présentent un défaut de régénération de la queue.

(C) Les embryons ayant une protéine dominante négative Tead4 (dnTead4) présentent un défaut de régénération de la queue (Hayashi et al., 2014).

D. Les différentes fonctions de la voie Hippo

La voie Hippo a un rôle critique dans plusieurs processus biologiques, physiologiques et pathologiques. Elle est plus particulièrement connue pour son rôle dans la croissance des organes et son implication dans le cancer mais elle est aussi impliquée dans différents processus physiologiques.

1. Les fonctions de la voie Hippo dans de multiples processus physiologiques

Récemment, la voie Hippo a été impliquée dans la régulation des cellules souches et les protéines YAP1 et TAZ sont nécessaires au maintien de la pluripotence des cellules souches murines et humaines respectivement (Alarcon et al., 2009; Lian et al., 2010; Qin et al., 2012; Varelas et al., 2008). Les protéines sont essentielles pour la différenciation des cellules souches mésenchymateuse (MSC) et le knock-down des protéines dans ces cellules entraînent la diminution de l'ostéogenèse et l'augmentation de l'adipogenèse (Dupont et al., 2011; Hong and Saint-Jeannet, 2005). Par ailleurs, les protéines YAP1/TAZ favorisent la différenciation myogénique et l'ensemble de ces travaux suggèrent que la voie Hippo joue un rôle important dans la différenciation cellulaire (Jeong et al., 2010; Judson et al., 2012; Watt et al., 2010).

La voie Hippo est également impliquée dans la régénération tissulaire. Chez des souris dans lesquelles une lésion intestinale a été provoquée, le niveau d'expression de la protéine YAP1 augmente très fortement et l'épithélium endommagé subi une régénération qui est dépendante de l'activité de la protéine (Cai et al., 2010). Chez la drosophile, Yki est nécessaire à la régénération tissulaire de l'intestin et des disques de l'aile (Grusche et al., 2011; Karpowicz et al., 2010; Ren et al., 2010; Staley and Irvine, 2010; Sun and Irvine, 2011). Par ailleurs, le complexe protéique YAP1/TEAD1 joue un rôle important lors de la régénération de la queue de têtard chez le xénope (Hayashi et al., 2014) (Figure 30). Une mutation dans la protéine TEAD1 qui empêche son interaction avec la protéine YAP1 est responsable d'une maladie dégénérative chez l'homme suggérant l'importance du complexe protéique dans la.

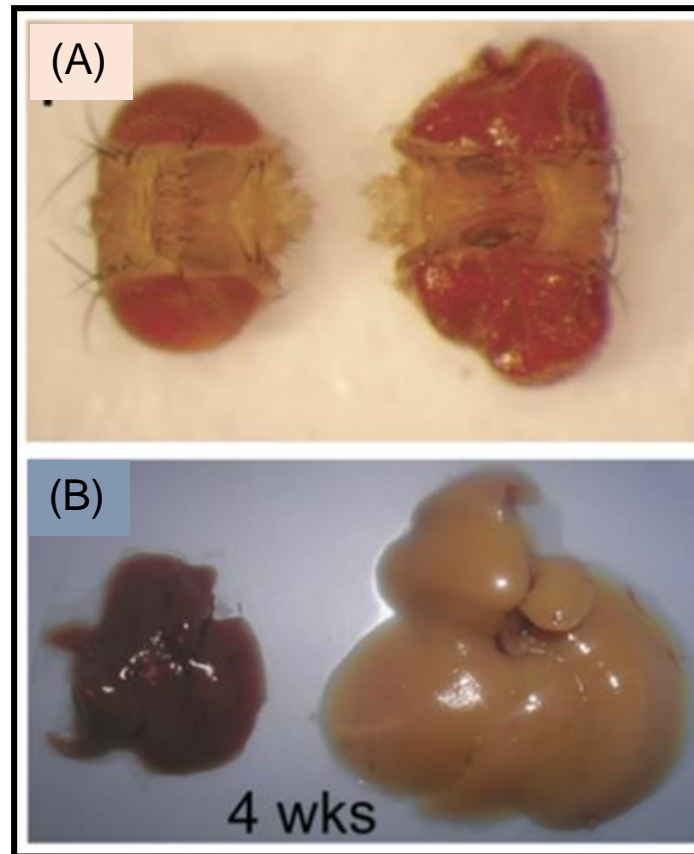


Figure 31 : La voie Hippo est impliquée dans la croissance des organes.

(A) Chez la drosophile, la surexpression de la protéine YAP1 entraîne l'augmentation de la taille des yeux (droite) par rapport à la drosophile sauvage (gauche).

(B) Chez la souris, la surexpression de la protéine YAP1 dans le foie entraîne une forte augmentation de sa taille (D sur la droite) par rapport à la condition contrôle (D sur la gauche) après quatre semaines (4 wks) (Dong et al., 2007).

croissance tissulaire et l'homéostasie (Chen et al., 2010b; Jonasson et al., 2007; Li et al., 2010; Zhao et al., 2008a). La protéine YAP1 est essentielle au développement murin, le développement embryonnaire des souris KO pour le gène s'arrête au stade E 8.5 (Morin-Kensicki et al., 2006).

2. La voie Hippo et le contrôle de la taille des organes

La voie Hippo est traditionnellement connue comme la voie de signalisation qui régule la croissance des organes. Chez la drosophile, les mutants perte de fonction des gènes *Hpo*, *Sav*, *Wts* et *Mats* provoquent une excroissance tissulaire des yeux, des ailes et d'autres appendices (Figure 31) (Harvey et al., 2003; Justice et al., 1995; Kango-Singh et al., 2002; Lai et al., 2005; Pantalacci et al., 2003; Tapon et al., 2002; Udan et al., 2003; Wu et al., 2003; Xu et al., 1995b). Cette fonction de régulation de la taille des organes est conservée chez les mammifères et la surexpression de la protéine YAP1 dans le foie ou le cœur de souris provoque une augmentation dramatique de la taille des organes correspondants (Figure 31) (Camargo et al., 2007; Dong et al., 2007; von Gise et al., 2012). Le KO conditionnel des gènes *MST1/2* dans le foie ou le cœur induit également une augmentation de la taille de l'organe chez la souris (Heallen et al., 2011; Lee et al., 2010; Lu et al., 2010; Song et al., 2010; Zhou et al., 2009). On peut penser que tous les régulateurs en amont de la voie Hippo travaillent de manière coordonnée pour moduler la voie et contrôler *in fine* la taille finale des organes. Les forces mécaniques peuvent être envisagées comme des « senseurs » qui évaluent la taille de l'organe en développement et intégrer cette information dans la voie Hippo qui en retour ajuste le niveau d'expression de l'effecteur YAP1.

3. La voie Hippo comme suppresseur de tumeurs

Chez la drosophile, les différents membres de la voie Hippo ont été identifiés comme des gènes suppresseurs de tumeurs. De manière générale, les protéines kinases de la voie sont des suppresseurs de tumeurs alors que les effecteurs de la voie Yki/YAP1/TAZ sont des oncoprotéines.

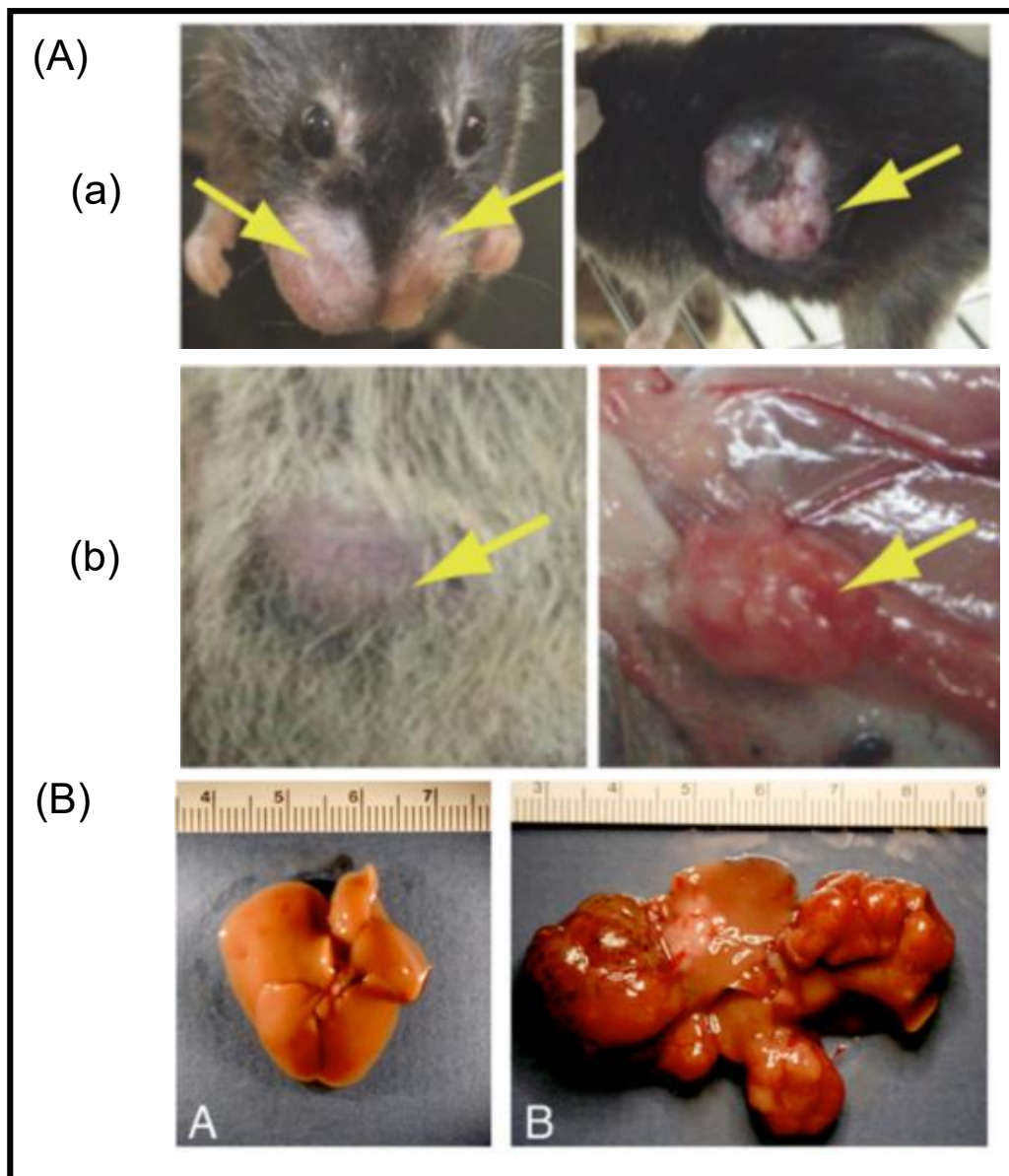


Figure 32 : La voie Hippo agit comme suppresseur de tumeur.

(A) Des souris mutantes pour le gène *Mob1* présentent de très nombreux cancers tels que le cancer de la peau (a) ou le cancer de la glande mammaire (b) (Nishio et al., 2012).

(B) Des mutations de la protéine Salvador dans le foie de souris entraînent une augmentation de la taille du foie par rapport aux souris contrôles [A] ainsi que la formation de nodules cancéreux [B] (Lu et al., 2010).

Des niveaux élevés de protéines YAP1/TAZ combinés à leur localisation nucléaire sont fréquemment observés dans les cancers chez l'homme (Chan et al., 2008; Fernandez et al., 2009; Steinhardt et al., 2008; Xu et al., 2009; Zhao et al., 2007). Des souris transgéniques dans lesquelles la protéine YAP1 a été surexprimée développent une hyperplasie et des tumeurs (Camargo et al., 2007; Dong et al., 2007; von Gise et al., 2012). De la même façon, l'inactivation de la voie Hippo par mutation d'un ou de plusieurs de ses composants en amont de Yki/YAP1/TAZ a pour effet l'accumulation nucléaire de YAP1 et le développement de tumeurs chez la souris. Ainsi, les souris déficientes en MOBKL1A/B développent de nombreux cancers de type cutané, pulmonaire ou des glandes mammaires (Figure 32A). Des mutations du gène *SALVADOR* ciblées dans le foie de souris entraînent la formation de nodules cancéreux (Lee et al., 2008; Lu et al., 2010; Nishio et al., 2012; Song et al., 2010; St John et al., 1999; Zhou et al., 2009) (Figure 32B).

Les protéines YAP1/TAZ peuvent induire la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) qui est un phénomène crucial dans la formation des métastases (Chen et al., 2012; Lamar et al., 2012; Lei et al., 2008; Overholtzer et al., 2006; Thiery et al., 2009). De plus, la protéine TAZ maintient l'auto-renouvellement des cellules souches du cancer du sein et induit l'initiation tumorale (Cordenonsi et al., 2011). Ces résultats soulignent l'importance de la voie Hippo dans le développement du cancer. La connexion entre la voie Hippo, les forces mécaniques et la signalisation par les récepteurs GPCRs fournit de nouvelles pistes pour élucider des mécanismes de tumorigenèse jusque-là peu explorés. Les récepteurs GPCRs sont cruciaux dans le développement du cancer, et une dérégulation de la voie de signalisation médiée par ces récepteurs a été identifiée dans de nombreux types de cancers chez l'homme (Dorsam and Gutkind, 2007). L'augmentation de la production de certains de leurs ligands, comme l'autotaxine, peut favoriser le cancer des glandes mammaires chez la souris (Liu et al., 2009). De plus, l'activité aberrante des Rho GTPases et des molécules régulatrices des récepteurs GPCRs peut aussi contribuer à la formation de cancer en régulant l'activité des protéines YAP1/TAZ (Metaye et al., 2005; Sahai and Marshall, 2002). La propriété oncogénique de YAP1, démontrée dans de nombreux travaux, ne constitue pas la seule fonction de la protéine, qui peut aussi être pro-apoptotique. Ceci est relié à l'observation que la protéine peut s'associer avec le facteur de transcription p73, membre de la famille des protéines p53. Or p73 est

connu pour son rôle inducteur de l'apoptose en réponse à des dommages de l'ADN. Le complexe YAP1-p73 se forme en réponse aux dommages de l'ADN et repose sur l'interaction entre le domaine WW de la protéine YAP1 et le motif PPPPY situé à l'extrémité C-terminale de la protéine p73 (Strano et al., 2001). Par ailleurs, aucune interaction n'a été observée entre la protéine YAP1 et d'autres membres de la famille p53 (p63, p53). La formation du complexe YAP1-p73 est corrélée avec une forte augmentation de l'activité de la protéine p73, indiquant que la protéine YAP1 est impliquée dans le processus pro-apoptotique (Basu et al., 2003). La formation du complexe YAP1-p73 est sous la dépendance de la protéine kinase Akt qui peut phosphoryler la protéine YAP1, induire sa rétention dans le cytoplasme et empêcher sa liaison dans le noyau avec la protéine p73 et par là même réduire l'apoptose induite par les dommages à l'ADN (Basu et al., 2003). Une boucle de contrôle qui favorise l'apoptose a été décrite. Le complexe YAP1-p73 active alors la transcription du gène codant le suppresseur de tumeur promyélotique leukemia (PML) qui à son tour se lie à la protéine YAP1 et stabilise son interaction avec la protéine p73 stimulant ainsi son activité (Lapi et al., 2008). L'ensemble de ces travaux montrent que les protéines YAP1 et p73 agissent en synergie pour former un complexe activateur des gènes pro-apoptotiques.

La voie de signalisation Hippo est devenue de plus en plus complexe et intègre une multitude de signaux qui aboutit à un contrôle très fin de l'homéostasie. Toute perturbation de cette voie entraîne des dérèglements majeurs associés à des pathologies multiples chez l'homme. La connaissance intime des mécanismes régulateurs de la voie permet d'envisager dans le futur un ciblage spécifique de cette voie à des fins thérapeutiques.



Figure 33 : Photographies d'un mâle (à droite) et d'une femelle (à gauche) adultes *Xenopus laevis*. (Images personnelles).

IV. Mise en place du système nerveux

Le système nerveux, dont la fonction essentielle est la communication, est apparu très tôt au cours de l'évolution. Dès que les animaux multicellulaires ont évolué, les neurones, cellules chargées du transfert de l'information, ont fait partie de leurs tissus. Le système nerveux des métazoaires varie en complexité du simple nerf de la méduse aux billions de neurones interconnectés et spécifiquement assemblés dans le cerveau humain. Malgré cette complexité et diversification, les neurones et les systèmes nerveux de tous les animaux multicellulaires présentent des caractéristiques communes et les principes sous-jacents du développement neural ont été maintenus au cours de l'évolution. Tous les embryons des vertébrés se développent de manière similaire, mais les embryons d'amphibiens se sont révélés particulièrement adaptés à l'étude du développement neural et ceci dès la fin du XIX^{ème} siècle. Les embryologistes ont privilégié plusieurs espèces d'amphibien pour leurs travaux et, de par ses nombreux avantages, l'amphibien xénope est progressivement devenu un modèle de choix pour l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires qui contrôlent la mise en place du système nerveux et la neurogenèse chez les vertébrés.

A. Le modèle amphibien *Xenopus laevis*

Le xénope est un amphibien anoure aquatique d'origine africaine appartenant à la famille des pipidés. Les espèces les plus utilisées en recherche sont *Xenopus laevis*, d'origine subtropicale et *Xenopus tropicalis*, d'origine tropicale. Les xénopes sont des espèces aquatiques primitives vivant dans des étangs et des mares et n'émergeant que pour respirer. Les femelles *X. laevis* mesurent entre 12 et 14 cm et les mâles entre 7 et 10 cm (Figure 33). L'espèce *X. tropicalis* est plus petite, les femelles mesurant entre 4 et 6 cm et les mâles entre 3 et 4 cm. Chez ces espèces, la fécondation est externe puisque la femelle et le mâle émettent leurs gamètes dans le milieu extérieur. Au moment de la reproduction, le mâle s'accroche sur le dos de la femelle grâce à des callosités (épaississement épidermiques pigmentés et kératinisés) présentes à la surface de ses membres antérieurs. Le mâle malaxe le ventre de la femelle, tout au long de l'accouplement, afin de faire sortir les ovocytes qu'il arrose directement de sperme.

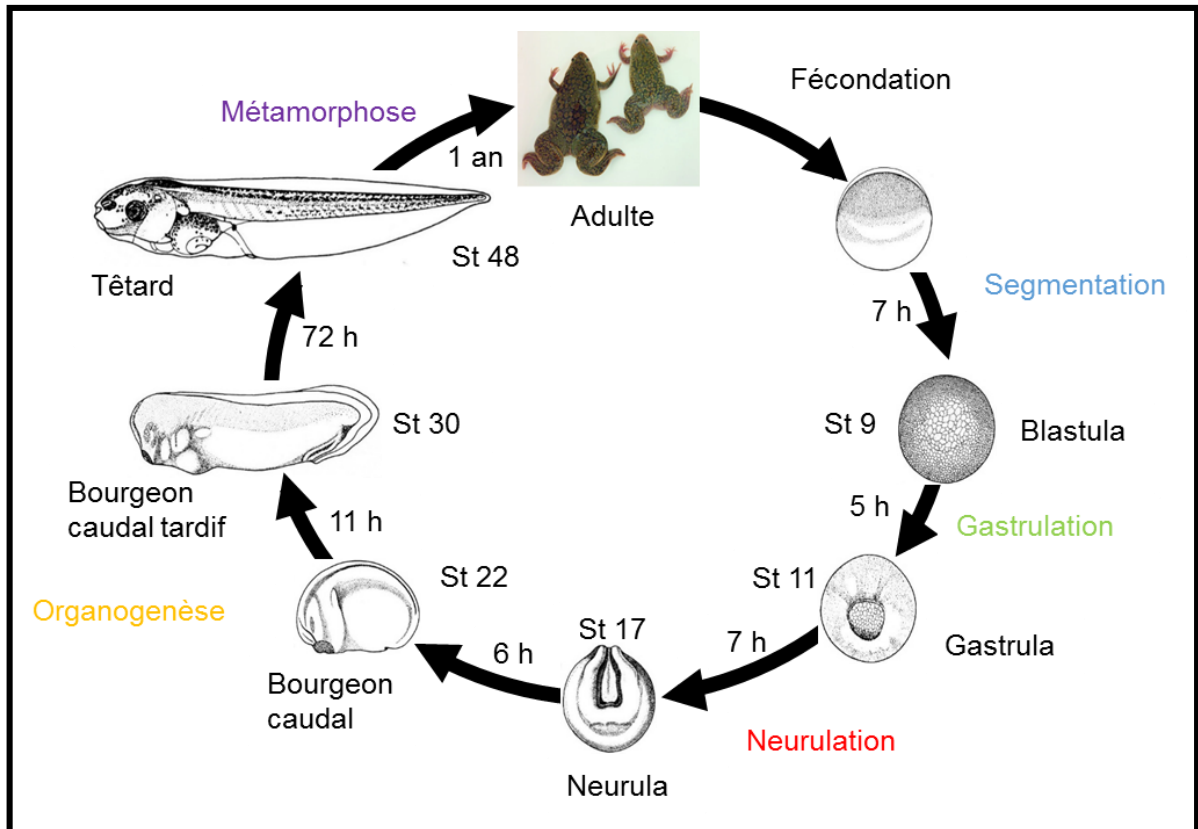


Figure 34 : Le cycle du développement embryonnaire de *Xenopus laevis*.

Les différentes étapes du cycle du développement embryonnaire sont indiquées par des couleurs différentes. Leurs durées approximatives à 23°C sont également notées. Les schémas des embryons et les stades correspondants sont issus des tables de Nieuwkoop et Faber.

1. Les avantages du modèle

Le xénope présente plusieurs avantages qui en font un organisme modèle pour l'étude du développement embryonnaire :

- l'obtention par fécondation *in vitro* de plusieurs centaines d'œufs,
- le développement embryonnaire externe,
- le développement synchrone des embryons,
- la taille des embryons (1 à 2 mm) permettant des expériences de micro-injections et de micro-dissections.

Depuis les années 1950, l'espèce *Xenopus laevis* s'est imposée comme un modèle de référence pour étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation cellulaire, l'organogenèse au cours de l'embryogenèse et la régénération (Harland and Grainger, 2011) (Beck et al., 2009). Ce modèle permet l'utilisation d'un large éventail de techniques comme la culture d'explants embryonnaires, la transgénèse transitoire (micro-injection d'ARNm ou d'ADNc) ou permanente (Kroll and Amaya, 1996; Sparrow et al., 2000). Malgré ces avantages, *Xenopus laevis* présente deux inconvénients : un génome pseudo-tétraploïde et un temps de génération long de 16 à 18 mois (Hellsten et al., 2007). L'invalidation de gènes peut tout de même être réalisée par l'utilisation de la stratégie morpholino (ou Mo) antisens (Heasman, 2002). L'espèce *Xenopus tropicalis* est diploïde et doit permettre dans le futur une approche génétique du développement dans ce modèle.

2. Le développement du xénope

Le cycle de développement du xénope est très court et peut être divisé en plusieurs étapes communes aux vertébrés (fécondation, segmentation, gastrulation, neurulation et organogenèse) (Figure 34) qui permettent d'obtenir un embryon autonome en 4 jours environ à 23 °C. Ces différentes phases ont été regroupées dans une table de développement extrêmement bien décrite (Nieuwkoop and Faber, 1975). A la différence d'autres vertébrés, le développement du xénope présente une étape supplémentaire de métamorphose qui correspond à la dégénérescence de la queue et la croissance des quatre membres de l'adulte. La durée du cycle de développement

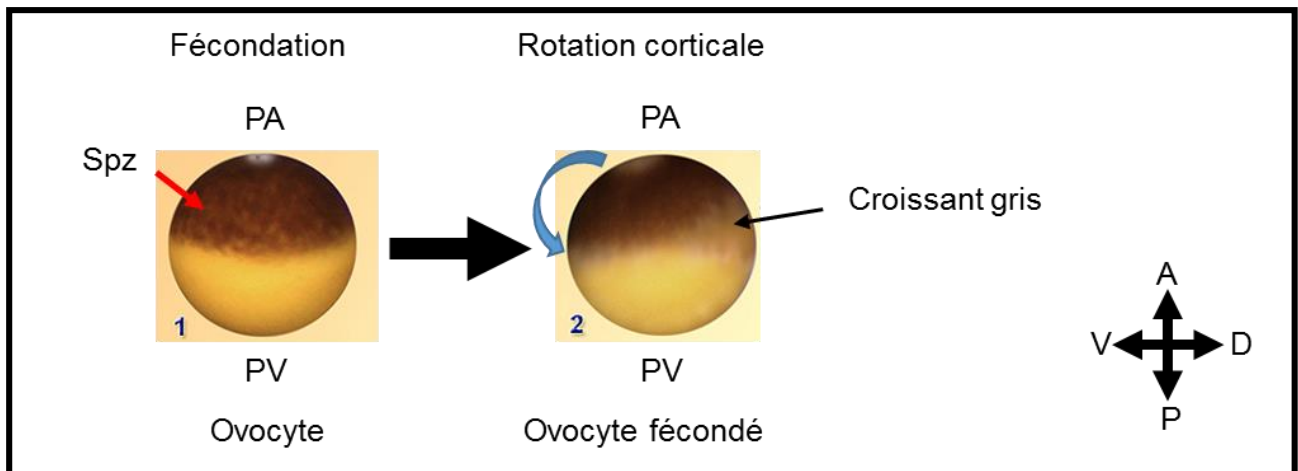


Figure 35 : Acquisition des axes de polarité chez le xénope.

Lors de la fécondation, le point d'entrée du spermatozoïde (Spz) dans l'ovocyte détermine le futur côté ventral de l'embryon. L'évènement fondateur de la mise en place de l'axe dorsoventral est la rotation corticale. Elle aboutit à la formation du croissant gris qui marque le futur côté dorsal de l'embryon. La flèche indique le sens de la rotation corticale. Les axes de l'embryons sont notés A : Antérieur, P : Postérieur, V : Ventral, D, Dorsal. PA : Pôle Animal, PV : Pôle Végétatif. (D'après snv.jussieu.fr).

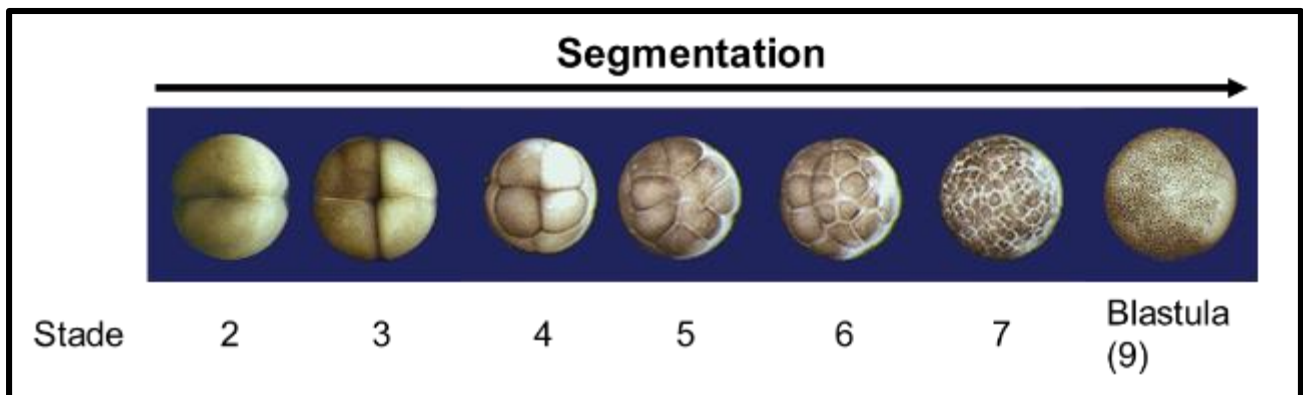


Figure 36 : La segmentation chez le xénope.

Environ 1h30 après la fécondation, se produit la première division de l'embryon qui donne deux cellules de taille identique appelées blastomères et qui détermine la symétrie bilatérale de l'embryon. Ensuite, les divisions se succèdent rapidement pour aboutir un embryon appelé blastula composé de milliers de cellules. Les stades sont numérotés selon les tables de Nieuwkoop et Faber. (D'après snv.jussieu.fr).

embryonnaire est dépendante de la température chez *X. laevis*, ce qui permet d'adapter la durée du cycle ou de certaines phases pour mieux appréhender certains stades embryonnaires

a. La fécondation

L'ovocyte de xénope est une cellule polarisée, avec le pôle animal qui présente une pigmentation plus importante que le pôle végétatif (figure 35). Cet axe correspond au futur axe antéropostérieur. La taille importante de l'ovocyte s'explique par des phases croissantes de vitellogenèse, caractérisées par l'accumulation de métabolites, d'organelles, de protéines, d'acides ribonucléiques et de *vitellus* au sein de l'ovocyte primaire. Le vitellus représente 80% des réserves protéiques de la cellule. Il permet à l'embryon de se développer en absence de ressources nutritives jusqu'au stade larvaire, stade à partir duquel l'embryon pourra prélever sa nourriture dans le milieu environnant. La fécondation correspond à la fusion entre un ovocyte et un spermatozoïde. Elle a lieu au pôle animal et entraîne une cascade d'événements à la fois aux niveaux membranaire, cytoplasmique et nucléaire. Ces modifications conduisent à l'activation du métabolisme de l'œuf, au blocage de la polyspermie et à l'initiation du programme de développement. L'entrée du spermatozoïde provoque une rotation de 30° des pigments corticaux qui définit une zone moins pigmentée ou croissant gris à l'opposé du point d'entrée du spermatozoïde, très visible dans plusieurs espèces d'amphibien mais pas chez le xénope. Cette région détermine l'axe de symétrie bilatérale et le côté dorsal de l'embryon (Figure 35). Au niveau du croissant gris, il y a activation de déterminants dorsaux, comme les protéines Dishevelled (Miller et al., 1999) et Vg1 (Thomsen and Melton, 1993), qui interviennent dans la mise en place du mésoderme et des structures dorsales.

b. La segmentation

La fécondation est suivie par l'étape de segmentation qui est composée de douze divisions rapides et synchrones qui permettent d'atteindre le stade blastula en 6 h, stade auquel l'embryon est composé de 4096 cellules (Figure 36). La première division mitotique débute dès la fécondation et dure environ 1h30 et détermine la symétrie bilatérale de l'embryon. La deuxième division détermine l'axe dorso-ventral de l'embryon et se fait perpendiculairement au premier sillon de division, la troisième

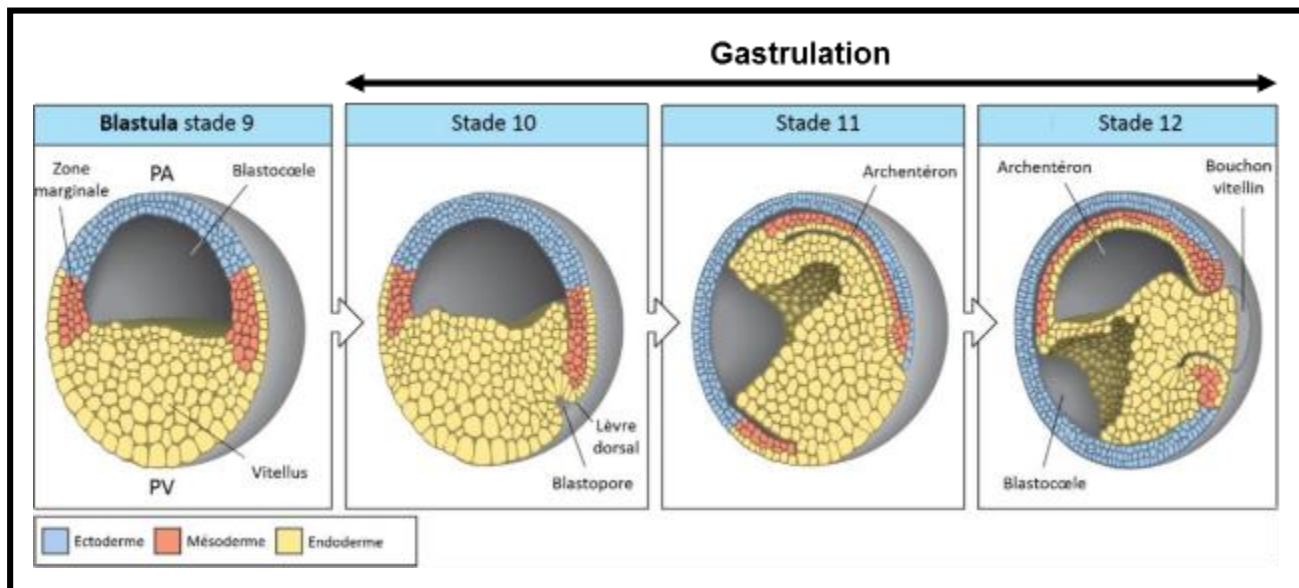


Figure 37 : Représentation schématique simplifiée de la gastrulation chez le xénope.

La gastrulation fait suite à la segmentation et donne lieu à d'importants mouvements cellulaires qui aboutissent à la formation des trois feuilletts embryonnaires l'ectoderme (en bleu), le mésoderme (en rouge) et l'endoderme (en jaune). PA : Pôle Animal, PV : Pôle Végétatif. (D'après Lewis Wolpert Principles of Development, 1998).

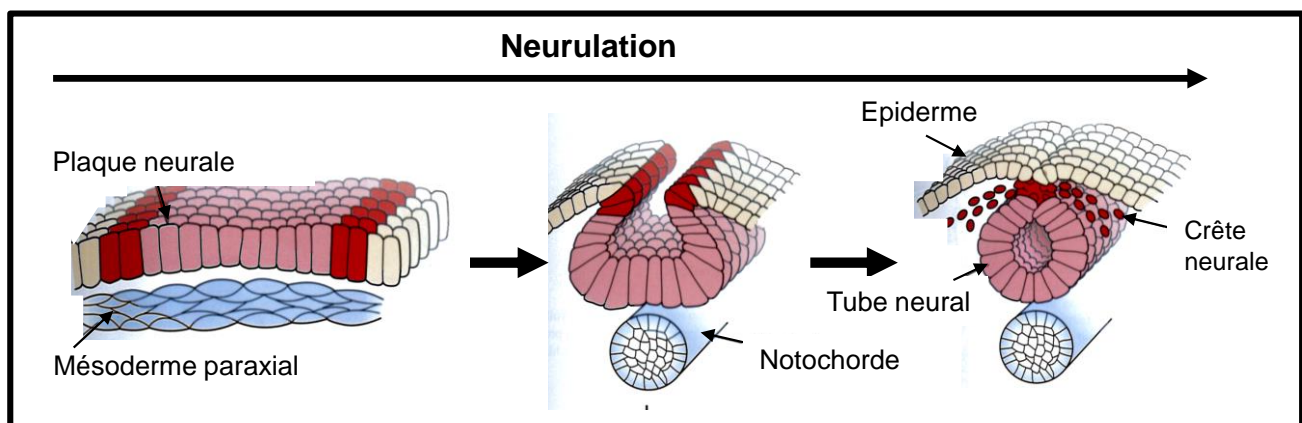


Figure 38 : Représentation schématique de la neurulation.

La plaque neurale (en rose) va se refermer sur elle-même pour former un tube qui va se séparer de l'ectoderme (en jaune). Le mésoderme (en bleu) va s'individualiser pour former la notochorde. En même temps un groupe de cellules (en rouge), les cellules de la crête neurale, se forme entre la plaque neurale et l'épiderme. (D'après William A. Harris : Development of the Nervous System, Third Edition, 2012).

division se fait selon un axe équatorial par rapport à la première et détermine l'axe antéro-postérieur. Ensuite les plans de division alternent. Les divisions mitotiques sont rapides (30 min) et comportent seulement les phases S et M. À partir de la troisième division, les cellules ne possèdent plus la même taille, les cellules du pôle animal sont plus petites que celles du pôle végétatif. A la fin de la segmentation (stade 8-9), l'embryon a atteint le stade de *blastula* caractérisé par la présence d'une cavité ou blastocœle. La transcription du génome débute, on parle alors de transition mid blastuléenne (MBT) et avant cette transition l'embryon vit sur la réserve des ARNm maternels emmagasinés lors de l'ovogenèse.

c. La gastrulation

La gastrulation se caractérise par des mouvements cellulaires coordonnés qui remanient profondément les blastomères assurant la mise en place des trois feuillets embryonnaires : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme (Figure 37). Les mouvements morphogéniques sont initiés lors de l'induction mésodermique et se caractérisent par une invagination au niveau dorsal. Ces déplacements de populations entières de cellules les unes par rapport aux autres sont fortement régulés par les interactions cellules/cellules, cellule/matrice ainsi que par des signaux initiés lors de l'induction mésodermique (Ataliotis et al., 1995; Kuhl et al., 2001; Stumpo et al., 2004). Ces mouvements d'invagination font apparaître le blastopore et la partie située au niveau antérieur du blastopore est appelée lèvre dorsale blastoporale. Les cellules mésodermiques migrent ensuite à l'intérieur de l'embryon sur la matrice extracellulaire le long du toit du blastocœle. Une nouvelle cavité ou archentéron prend la place du blastocœle jusqu'à le faire disparaître totalement à la fin de la gastrulation. En fin de gastrulation (stade 12.5), l'embryon est tridermique : les couches externes de l'embryon sont formées de l'ectoderme, l'intérieur de l'embryon est constitué de l'endoderme et de l'archentéron, et le mésoderme se situe entre ces deux tissus.

d. La neurulation

La neurulation permet la mise en place de l'ébauche du futur système nerveux dans la partie dorsale de l'ectoderme de l'embryon. Le neuroectoderme va se refermer sur lui-même pour former le tube neural et se séparer progressivement de l'épiderme (Figure 38).

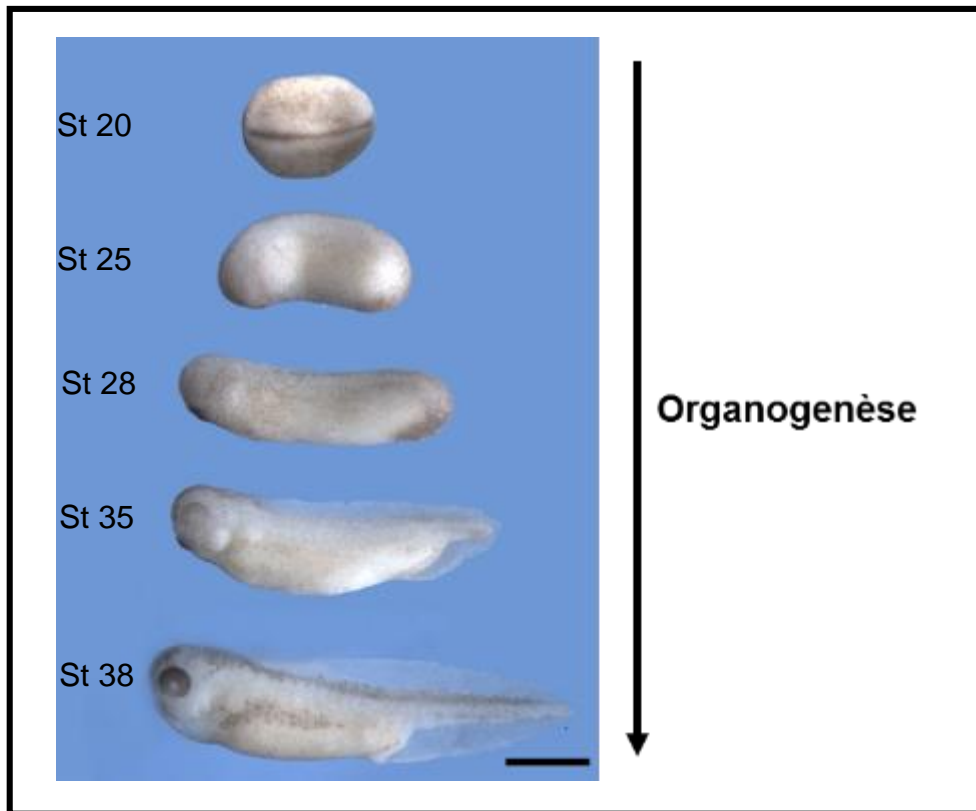


Figure 39 : Représentation schématique de l'organogenèse du xénope.

Au cours de l'organogenèse, le corps de l'embryon se remodèle pour prendre la forme du têtard (Images personnelles). St : Stade selon les tables de Nieuwkoop et Faber

Le mésoderme va s'individualiser pour former la corde, les somites et les pièces intermédiaires. L'endoderme va se refermer autour de l'archentéron qui va former la future lumière du tube digestif. A la fin de la neurulation, l'embryon a atteint le stade de bourgeon caudal (stade 22). La future queue se forme dans la partie postérieure de l'embryon sous forme d'une masse mésodermique. Du côté antérieur de l'embryon, le champ morphogénétique de l'œil apparaît.

e. L'organogenèse

Au cours de l'organogenèse, le corps de l'embryon va se modeler pour prendre la forme du têtard d'amphibien (Figure 39). L'embryon au stade bourgeon caudal entame la phase d'organogenèse qui conduit à la différenciation des feuilletts embryonnaires en divers organes. C'est tout un ensemble de régulations spatio-temporelles qui préside à l'organogenèse : les cellules vont recevoir des signaux distincts, dépendants de leur position, conduisant à l'orientation de chaque cellule ou groupe de cellules dans une voie de différenciation précise. Ces signaux sont sous le contrôle des gènes homéotiques tels que les gènes *Hox* qui déterminent la nature de chaque segment au sein de l'embryon en activant ou en réprimant de nombreux gènes cibles. Ces gènes sont induits au cours de la gastrulation et de la neurulation par des facteurs de croissance BMPs, FGF et acide rétinoïque (Kolm et al., 1997; Slack et al., 1996).

L'organogenèse laisse ensuite place à la métamorphose qui est induite par la sécrétion de l'hormone thyroïdienne T3, conduisant à la formation d'un adulte immature. Le plan d'organisation du têtard aux niveaux cellulaire, tissulaire et des organes est profondément modifié, avec la perte des appendices larvaires au profit de l'apparition de structures adultes. Cette transition s'accompagne également d'une réorientation du métabolisme.

B. Mécanismes moléculaires impliqués lors de l'induction neurale

Les mouvements complexes lors de la gastrulation aboutissent à la formation d'un embryon comportant trois feuilletts, l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. Ces mouvements vont créer de nouvelles relations entre les feuilletts. La formation et

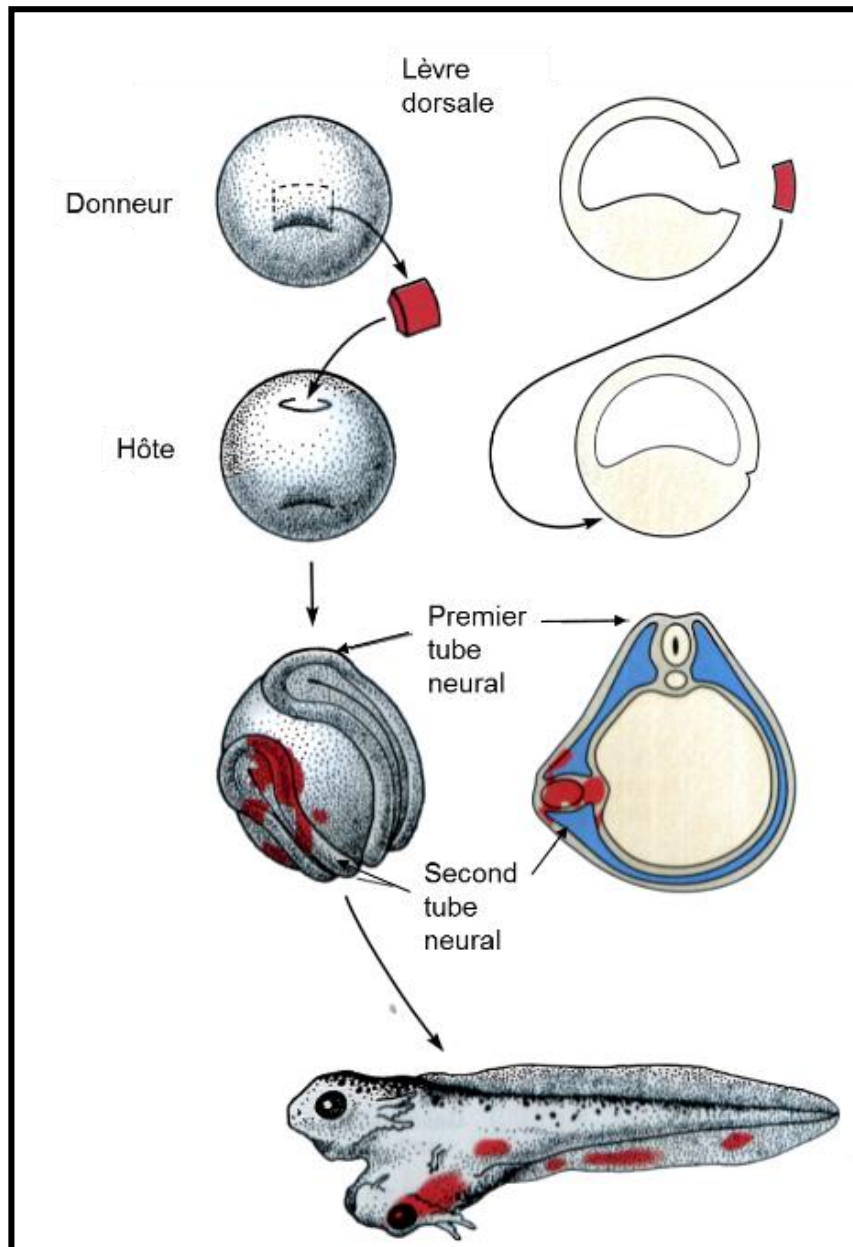


Figure 40 : Expérience de greffe de Spemann et Mangold.

Spemann et Mangold ont transplanté la lèvre dorsale du blastopore d'un embryon (rouge) à un embryon hôte. Un deuxième axe, qui comprend un tube neural, a été induit par le tissu greffé. Les cellules de la lèvre dorsale du blastopore donnent naissance à quelques tissus du second axe mais les cellules hôtes contribuent aussi au nouvel axe. Ils en ont conclu que la lèvre dorsale peut « organiser » les cellules hôtes à former un nouvel axe et ils ont nommé cette région de l'embryon l'organisateur. (D'après William A. Harris : Development of the Nervous System, Third Edition, 2012).

la détermination du territoire neural a été particulièrement bien étudié chez l'amphibien et le tissu neural est une conséquence des réarrangements qui se font lors de la gastrulation (Hamburger, 1969).

1. La nature moléculaire de l'inducteur neural

L'étude des mécanismes contrôlant l'induction neurale a mis en évidence l'implication de plusieurs voies de signalisation. Chez le xénope, des expériences de transplantation faites par Spemann et Mangold (1924) (Figure 40) ont montré que l'induction du tissu neural à partir de l'ectoderme dépendait de signaux dorsalisants provenant du « centre organisateur » ou « organisateur de Spemann » situé dans le mésoderme dorsal. La greffe de cet organisateur dans la partie ventrale d'une jeune gastrula conduit à la formation d'un second axe embryonnaire complet contenant un tube neural parfaitement organisé avec un cerveau, la moelle épinière et les yeux. Cependant, contrairement à ce que l'on pensait, les molécules inductrices provenant de l'organisateur n'agissent pas directement sur les cellules qui formeront le tissu neural, mais bloquent des molécules qui induisent les cellules de l'ectoderme à se différencier en épiderme (Hemmati-Brivanlou et al., 1994; Hemmati-Brivanlou and Melton, 1992). En effet, le facteur de croissance BMP4 (pour **B**one **M**orphogenic **P**rotein **4**), qui fait partie de la superfamille des protéines de type TGF β (pour **T**ransforming **G**rowth **F**actor- β), est sécrété dans tout l'ectoderme et induit les cellules de l'ectoderme à se différencier en épiderme. Les facteurs BMP se fixent sur leurs récepteurs, activent la voie de signalisation Smad et induisent la formation de l'épiderme. Le blocage de la voie de signalisation BMP *via* la micro-injection dans l'embryon d'un ARNm codant une forme à effet dominant négatif du récepteur BMP4 provoque la différenciation des cellules en cellules neurales (Xu et al., 1995a).

Plusieurs molécules sécrétées produites dans l'organisateur, et qui jouent un rôle dans l'induction neurale *via* l'inhibition de la signalisation BMP, ont été identifiées. Parmi celles-ci, la protéine Noggin qui est exprimée dans l'embryon au niveau des cellules de la lèvre dorsale du blastopore (Lamb et al., 1993), la protéine Chordin qui est exprimée dans l'organisateur (Sasai et al., 1994) et la protéine Follistatine également exprimée dans la région organisatrice de l'embryon lors de l'induction neurale

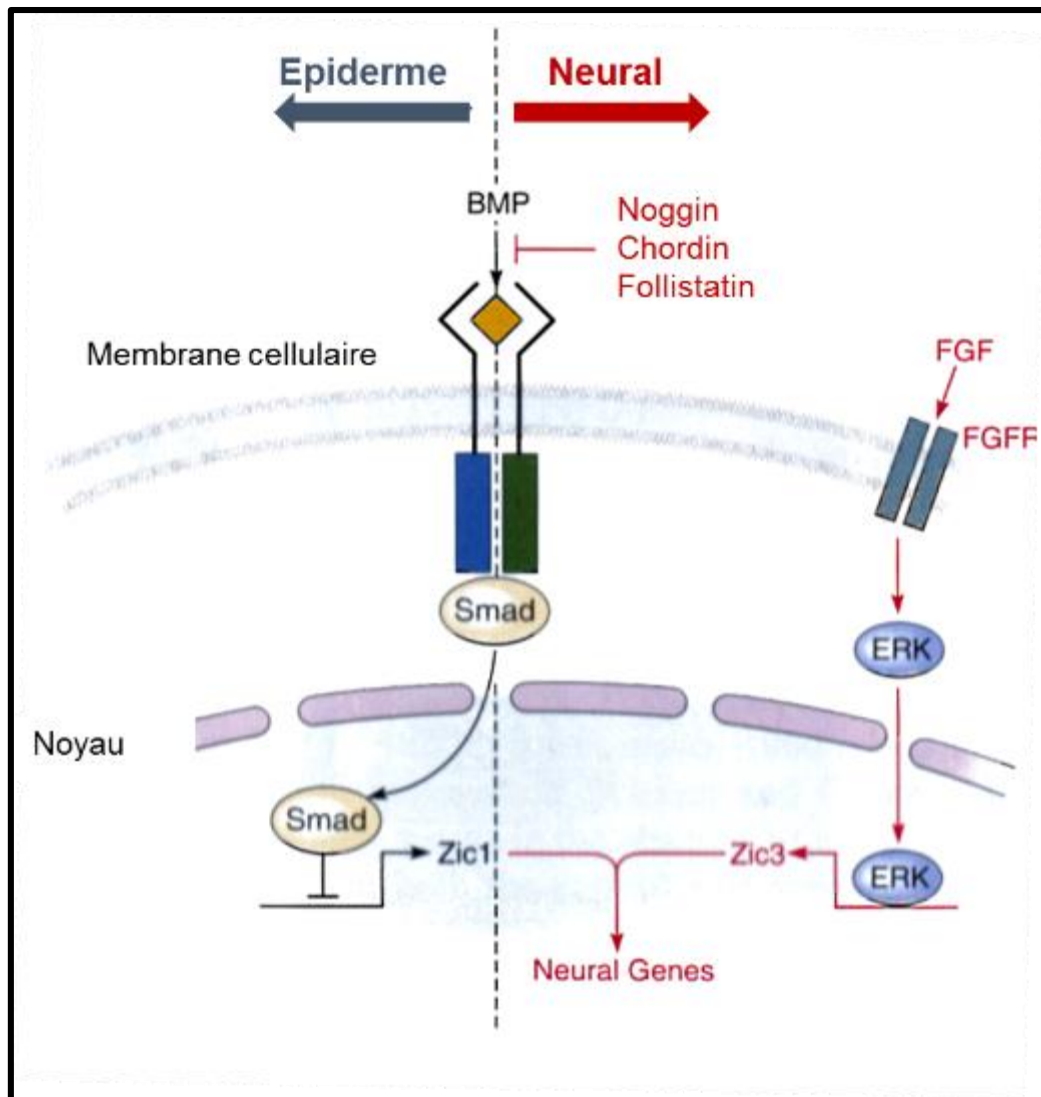


Figure 41 : Modèle de l'induction neurale « par défaut ».

L'activation de la voie de signalisation BMP entraîne la formation de l'épiderme. Dans l'ectoderme, BMP stimule son récepteur pour activer différentes protéines intracellulaires qui inhibent la transcription du gène *Zic1*. Quand le signal BMP est bloqué par les inhibiteurs de l'organisateur, la voie de signalisation Smad est inhibée et le gène *Zic1* est activé. Quand les récepteurs FGF sont activés, la voie de signalisation ERK active la transcription du gène *Zic3*. Les protéines *Zic1* et *Zic3* vont activer les gènes des progéniteurs neuraux. (D'après William A. Harris : Development of the Nervous System, Third Edition, 2012)

(Hemmati-Brivanlou et al., 1994), sont capables de se lier aux protéines BMPs et ainsi empêcher leur fixation à leurs récepteurs induisant les cellules de l'ectoderme en cellules neurales. Les protéines Noggin et Chordin se lient directement à la protéine BMP4 avec de forte affinité empêchant son interaction avec son récepteur, alors que la protéine Follistatine se lie aux protéines BMP7 et Activine. Ces différentes molécules définissent ainsi un modèle d'induction neurale «par défaut» (Figure 41); en présence d'un taux élevé de signalisation BMP, les cellules de l'ectoderme deviennent de l'épiderme alors qu'à un faible taux elles deviennent du tissu neural.

D'autres voies de signalisation sont également connues pour être impliquées dans la formation du tissu neural. C'est le cas de la voie de signalisation FGF (pour **F**ibroblast **G**rowth **F**actor). Dans les embryons de poulet, l'inhibition de la signalisation FGF avec un inhibiteur du récepteur au FGF, empêche la phase précoce de l'induction neurale (Streit et al., 2000). La voie FGF active la voie MAPK (pour **M**itogen **A**ctivated **P**rotein **K**inase) qui phosphoryle Smad 1, un effecteur de la voie de transduction des BMPs et entraîne sa dégradation (De Robertis and Kuroda, 2004; Fuentealba et al., 2007; Pera et al., 2003). Des études récentes ont montré que la voie de signalisation FGF pouvait être impliquée dans l'induction neurale de façon indépendante de sa capacité à inhiber les gènes cibles de la voie BMP (Aubin et al., 2004; Delaune et al., 2005; Linker and Stern, 2004). En effet, l'activation des récepteurs FGF va entraîner l'activation de la voie ERK qui va stimuler la transcription du gène *Zic3* qui active les gènes proneuraux (Figure 41). Toutes ces études montrent que le modèle d'induction neurale «par défaut» n'explique pas complètement le processus d'induction neurale qui requiert aussi l'intervention de la signalisation FGF.

Enfin, la voie de signalisation Wnt pourrait également être impliquée dans l'induction neurale. Les protéines Wnts sont des molécules sécrétées qui se fixent sur leurs récepteurs Frizzled. Les études ont montré que cette voie est capable de réprimer l'expression des gènes *BMP7/4* et qu'elle serait également nécessaire à l'expression des antagonistes des protéines BMPs tels que les protéines Noggin, Chordin et Follistatine au stade *blastula* précoce dans les cellules progénitrices du neuroectoderme (Baker et al., 1999). Un nouveau modèle d'induction neurale a été proposé et intègre les données de la littérature sur les effets médiés par la signalisation Wnt, TGF- β et FGF.

La polarité dorso-ventrale établie au moment de la fécondation est due à la mise en place d'un gradient de β -caténine, protéine effectrice de la voie de signalisation Wnt et dont la concentration décroît du pôle dorsal vers le pôle ventral. Le facteur de transcription VegT localisé dans le pôle végétatif active l'expression, à la transition mid blastuléenne (MBT), de plusieurs membres de la famille TGF- β , dont la protéine nodal (Xnr). A la MBT, un gradient de concentration de la protéine nodal se forme avec un maximum au pôle végétal qui détermine la position des cellules progénitrices de l'endoderme, du mésoderme et de l'ectoderme. C'est la combinaison de ces deux gradients qui va permettre la mise en place de l'organisateur de Spemann dans la région marginale dorsale de l'embryon. La différenciation de l'ectoderme en tissu neural nécessite l'activation de la β -caténine au stade blastula, qui inhibe la transcription des gènes *BMPs* et active l'expression des gènes *Chordin* et *Noggin* qui codent des antagonistes des protéines BMPs. Le signal FGF en faible quantité serait lui requis pour bloquer complètement la transcription et l'activité des BMPs (Delaune et al., 2005).

Les travaux visant à définir de nouveaux signaux régulateurs de la neurogenèse ont mis en lumière le rôle central du calcium. Plusieurs observations ont montré qu'une augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire était nécessaire et suffisante pour induire les cellules ectodermiques vers un devenir neural. Le calcium peut directement activer certains gènes cibles comme *xPRMT1b* qui contrôle en retour la transcription de gènes neuraux (Batut et al., 2005). Ce gène est exprimé dans les territoires neuraux et son expression au stade gastrula dépend d'un mécanisme qui est médié par les canaux DHP sensibles au calcium. Les expériences dans le modèle de calotte animale ont montré que la stimulation des canaux DHP sensibles au calcium augmente la $[\text{Ca}^{2+}]$ de façon transitoire. Cette augmentation est suffisante pour entraîner l'expression de marqueurs neuraux ainsi que la formation de neurones et ce même dans un contexte où la voie de signalisation BMP est active (Leclerc et al., 1997). En revanche, le blocage de ces canaux inhibe l'induction neurale (Leclerc et al., 1995). Les mécanismes d'activation de ces canaux restent encore inconnus mais le calcium pourrait inhiber la voie BMP *via* l'activation de la calcineurine qui bloque la phosphorylation des Smads (Leclerc et al., 2006).

2. Le contrôle de la neurogenèse : cascade d'activation des gènes proneuraux et inhibition latérale

La génération des neurones à partir de la région neurogénique des vertébrés et des invertébrés implique la production d'une cellule précurseur qui va générer de nombreux neurones. Cette cellule est capable de faire des divisions mitotiques alors que le neurone est une cellule post-mitotique. Dès la fin de la gastrulation, un certain nombre de cellules du neurectoderme cesse de se diviser et commence à se différencier en neurones primaires. Ces neurones apparaissent, dans l'embryon de xénope, de manière ponctuée et forment trois bandes longitudinales, médianes et latérales correspondant respectivement aux futurs neurones moteurs, interneurones et neurones sensoriels (Chitnis and Kintner, 1996; Chitnis, 1995).

La différenciation neuronale est sous le contrôle de deux types de gènes, les « gènes proneuraux » et les gènes neurogéniques. Les « gènes proneuraux », une fois activés, permettent aux cellules pluripotentes du neurectoderme de se différencier en neurones.

Chez la drosophile, quatre gènes proneuraux constituent le complexe *achaete* *scute* et sont requis pour la formation des neurones à partir de l'épiderme (Cabrera et al., 1987; Campos-Ortega, 1988). Ils codent des protéines bHLH (pour **b**asic **H**elix-**L**oop-**H**elix) qui se lient aux régions promotrices des gènes spécifiquement exprimés dans les neuroblastes (cellules précurseurs neurales) et activent leur transcription.

Chez le xénope, *XNgnr-1* (pour **X**enopus **N**eurogenin **r**elated-**1**) est un gène proneural qui code un facteur de transcription à domaine de liaison à l'ADN de type bHLH (Kanekar et al., 1997; Kim et al., 1997; Lee et al., 1995; Ma et al., 1996; Takebayashi et al., 1997). Ce gène active l'expression d'autres gènes codant des facteurs de transcription de type bHLH tels que *NeuroD* ou *Ebf2* impliqués dans la progression de la différenciation des cellules progénitrices neurales en neurones (Dubois et al., 1998; Lee et al., 1995; Pozzoli et al., 2001).

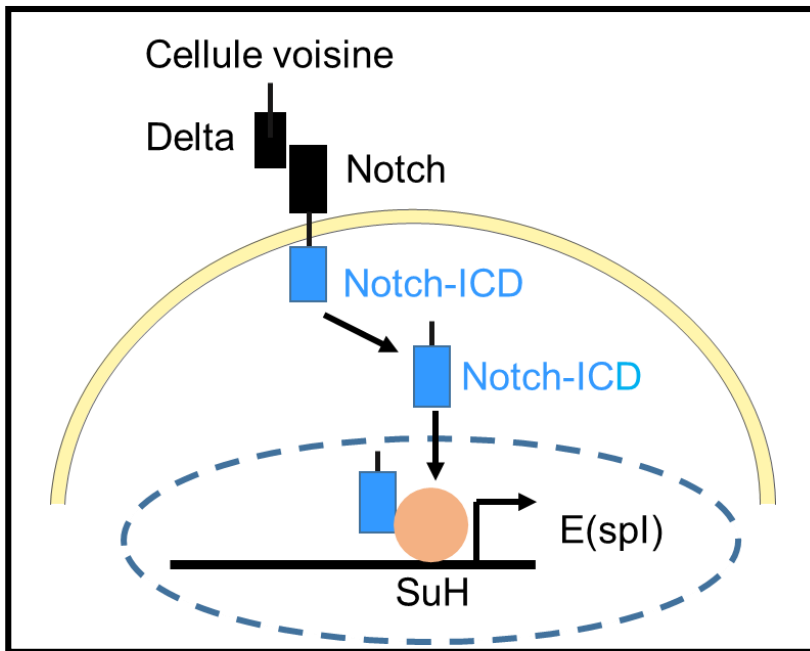


Figure 42 : La voie de signalisation Notch/Delta.

La liaison de la protéine Delta sur son récepteur Notch entraîne le clivage du domaine intracellulaire Notch-ICD qui interagit avec d'autres molécules telles que la protéine SuH chez la drosophile. Ce complexe va activer à son tour un certain nombre de gènes cibles dont E(spl) qui inhibe en retour l'expression des gènes Asc des cellules voisines. (D'après William A. Harris : Development of the Nervous System, Third Edition, 2012)

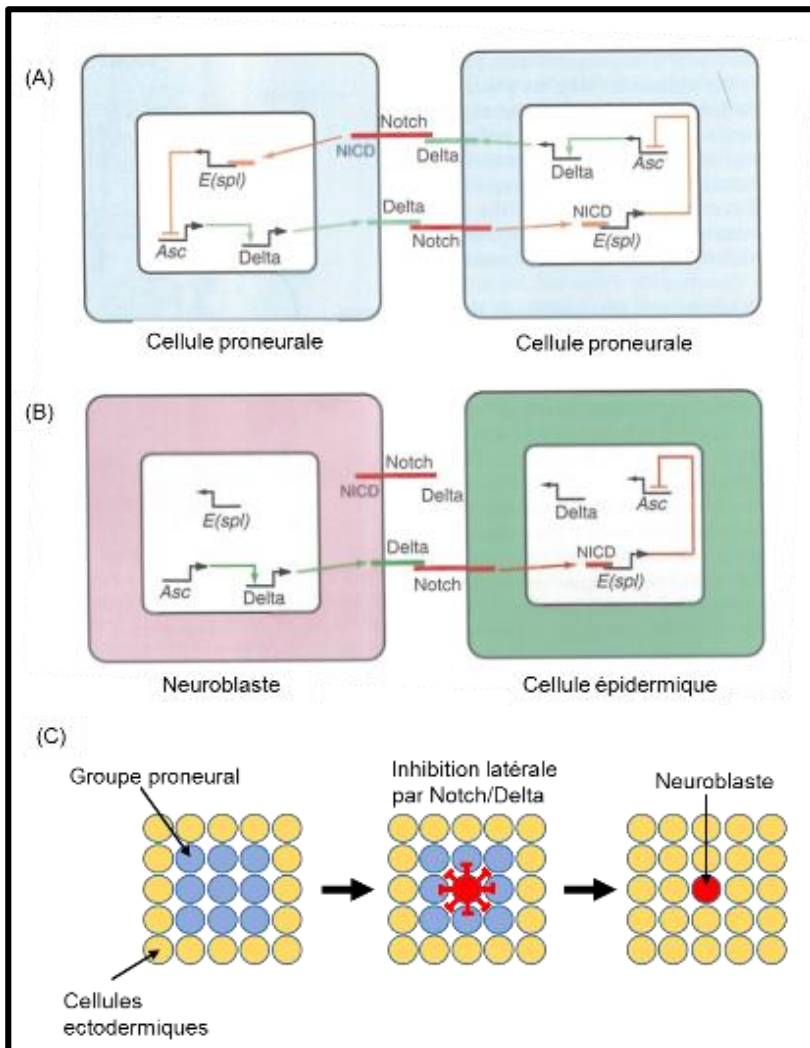


Figure 43 : Le mécanisme d'inhibition latérale.

(A) Dans le groupe de cellules proneurales, toutes les cellules expriment le gène Asc et les différents composants de la voie Notch.

(B) Le gène Asc active l'expression des gènes du neuroblaste en aval et du ligand de Notch, Delta. Cette voie forme une boucle positive de telle sorte que si une cellule dans le groupe exprime un plus fort taux de Asc que ses voisines, le niveau élevé de Asc va augmenter l'expression de Delta dans la cellule, qui va ensuite activer la voie de signalisation Notch plus fortement dans les cellules voisines. La forte activité de Notch dans les cellules voisines les amène à l'augmentation de l'expression de E(spl) qui va inhiber l'expression de Asc et diminuer leur expression de Delta. Cette boucle d'inhibition latérale assure qu'une seule cellule dans le groupe proneural devienne un neuroblaste (D'après William A. Harris : Development of the Nervous System, Third Edition, 2012)

(C) Représentation schématique de l'inhibition latérale.

Les gènes neurogéniques ont pour fonction d'inhiber la différenciation neuronale *via* un processus appelé « inhibition latérale ». Chez la drosophile, la voie de signalisation Notch/Delta est très importante pour distinguer le neuroblaste du reste des cellules proneurales et le destin des cellules dépend du taux d'activité de Notch. Dans les mutants nuls pour *notch*, presque toutes les cellules deviennent des neuroblastes et par conséquent les embryons présentent des défauts dans la formation de l'épiderme. Cette inhibition est due à l'activation de l'expression du gène *XDelta-1* qui code une protéine transmembranaire, ligand du récepteur Notch (Coffman et al., 1990). L'interaction entre les protéines Delta-1 et Notch entraîne le clivage du domaine intracellulaire de Notch (ou Notch-ICD) (De Strooper et al., 1999) (Figure 42). Le peptide Notch-ICD contient un signal de localisation nucléaire et va se concentrer dans le noyau où il interagit avec le facteur de transcription à doigt de zinc SuH (pour **S**uppressor of **H**airless) (Wettstein et al., 1997). L'interaction entre le peptide Notch-ICD et SuH transforme ce dernier en un activateur transcriptionnel induisant l'expression des gènes *E(spl)-C* (pour **E**nhancer of **s**plit **C**omplex). Ces gènes codent des protéines de type bHLH qui agissent comme des répresseurs de la transcription qui vont inhiber l'expression du gène *achaete scute* des cellules voisines (Figure 43 A, B et C).

Chez les vertébrés, la voie Notch-Delta est très conservée et l'interaction entre le peptide Notch-ICD et la protéine SuH entraîne l'inhibition du gène *Ngnr-1*. La cascade d'activation des gènes proneuraux est interrompue dans la cellule lorsqu'un niveau élevé de Notch est atteint et la différenciation neurale est inhibée. Les cellules dont la différenciation en neurones primaires est bloquée donneront plus tardivement au cours du développement des cellules gliales ou des neurones secondaires. Les voies proneurales et neurogéniques sont communes à tous les animaux. Des gènes proneuraux ont été identifiés chez *C. elegans* et même chez les cnidaires indiquant qu'il s'agit d'un système très ancien et très conservé au cours de l'évolution.

Chez le xénope, comme la plupart des vertébrés, la neurogenèse commence dans la plaque neurale au niveau de la région postérieure. Celle-ci se déroule en deux phases, la première commence dès la fin de la gastrulation et donne naissance aux neurones primaires nécessaires à la coordination des mouvements natatoires du têtard. Des molécules de signalisation sécrétées au niveau de la région médiane de la

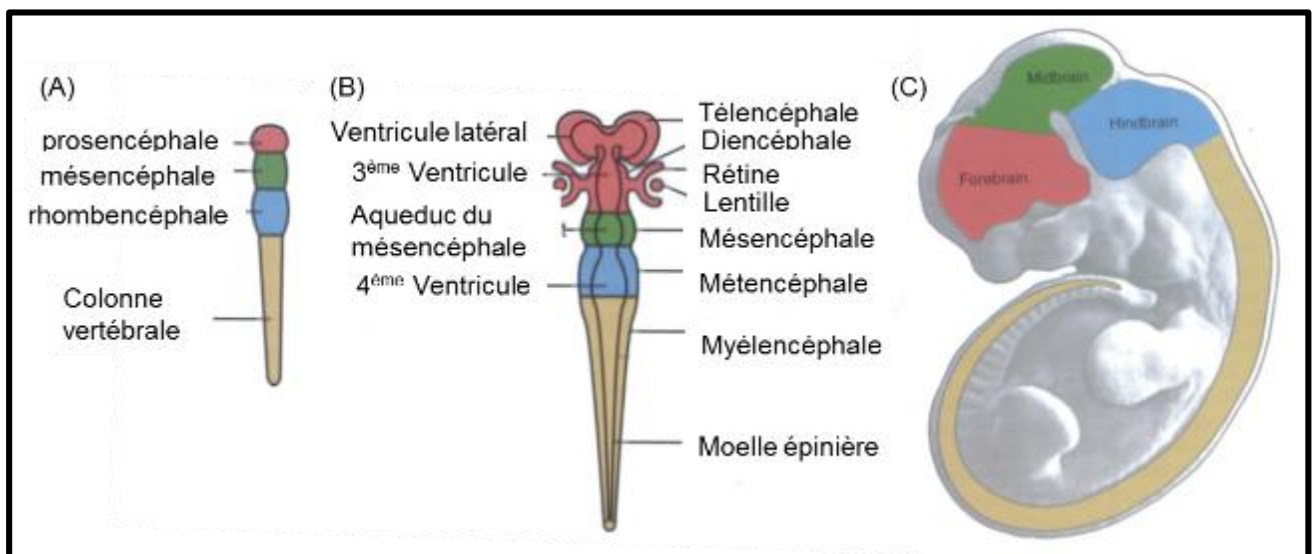


Figure 44 : Représentation schématique du cerveau des vertébrés.

Le cerveau des vertébrés et la moelle épinière se développent à partir du tube neural. Vue dorsale (A et B) et latérale (C) d'embryon humain à des stades de plus en plus tardifs.

(A) Les trois divisions primaires du cerveau proviennent du renflement du tube neural. Elles sont nommées cerveau antérieur (prosencéphale), cerveau moyen (mésencéphale) et cerveau postérieur (rhombencéphale).

(B) Le stade suivant résulte en la subdivision des différentes vésicules, le cerveau antérieur est divisé en télencéphale et diencéphale et le cerveau postérieur est divisé en métencéphale et myélencéphale.

(C) Organisation globale de l'embryon avec les différentes divisions du cerveau. (D'après William A. Harris : Development of the Nervous System, Third Edition, 2012).

plaque neurale et dans la notochorde régulent la position des domaines proneuraux. Parmi ces molécules, on peut citer Shh (pour **S**onic **h**edghog) et l'acide rétinoïque. L'expression de la protéine Shh dans la région médiane est elle-même régulée par le facteur nodal. La protéine Shh et l'acide rétinoïque contrôlent l'expression des gènes *Gli* (*Gli1*, *Gli2* et *Gli3*) et *Zic2*, qui ont une activité de répression permettant de limiter l'expression des gènes proneuraux au niveau des trois bandes longitudinales correspondant aux domaines proneuraux (Brewster et al., 1998; Franco et al., 1999).

La seconde phase, prend place approximativement au stade 46 et donne naissance à des neurones secondaires qui contribueront au système nerveux de l'adulte. En raison de son organisation simple et de son accessibilité, le système nerveux primaire du xénope constitue un excellent modèle pour l'étude des mécanismes contrôlant la différenciation neuronale.

3. La régionalisation du tissu neural

Comme le reste du corps chez les métazoaires, le système nerveux est régionalisé. La régionalisation antéro-postérieure du tissu neural a lieu en même temps que l'induction neurale. Dans les embryons de vertébrés, la plus grande partie du tube neural va donner la moelle épinière tandis que l'extrémité antérieure s'agrandit pour former les trois vésicules primaires du cerveau : le prosencéphale ou cerveau antérieur, le mésencéphale ou cerveau moyen et le rhombencéphale ou cerveau postérieur (Figure 44). Le prosencéphale donnera le diencephale et le télencéphale. Le diencephale sera à l'origine du thalamus, de l'hypothalamus et de la rétine, et le télencéphale sera à l'origine des lobes olfactifs et de l'hippocampe.

Le rhombencéphale se divisera en métencéphale qui donnera le cervelet et myélencéphale qui donnera la moelle. La région la plus caudale du cerveau est le rhombencéphale qui se développera en cerveau postérieur. Au cours de sa formation, le rhombencéphale se divise en segments ou rhombomères. Ce sont des unités répétées espacées régulièrement qui sont séparées par des frontières spécifiques.

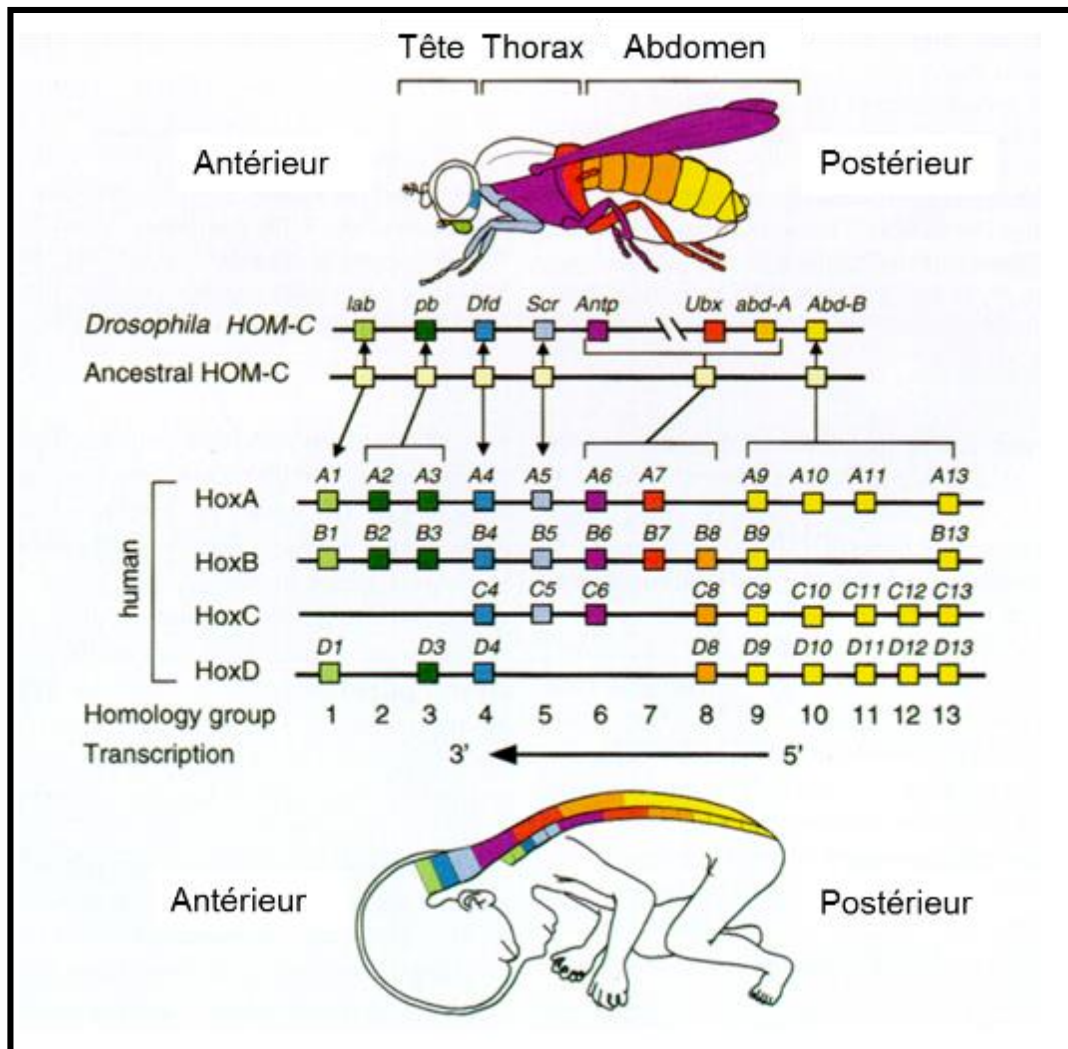


Figure 45 : Les gènes *Hox* chez la drosophile et les vertébrés.

Représentation schématique du complexe homéotique *HOM-C* de la drosophile, les quatre complexes *Hox* humain ainsi qu'un hypothétique complexe homéotique ancestral sont représentés, montrant leur possible relation phylogénétique (D'après (Mark et al., 1997).

a. Fonctions des gènes Hox

Chez les vertébrés et les invertébrés, les mécanismes qui contrôlent le développement régional du système nerveux sont dépendants des mécanismes qui définissent l'axe antéro-postérieur de l'embryon. Ces mécanismes ont été décrits à l'origine dans l'embryon de drosophile. L'axe antéro-postérieur de la mouche résulte de la distribution différentielle de deux molécules : *bicoid* au niveau antérieur et *nanos* au niveau postérieur. S'ensuit une cascade de régulation génique dépendant de groupes de gènes qui sont exprimés temporellement selon une séquence bien précise. Les gènes gap vont contrôler les gènes pair-rule qui vont activer les gènes de polarité segmentaire et les gènes homéotiques (*HOM-C* ou *Hox*) (Driever and Nusslein-Volhard, 1988; Stanojevic et al., 1991). Les gènes homéotiques correspondent à des mutations identifiées chez la drosophile qui donnent des phénotypes particuliers comme des drosophiles avec deux paires d'ailes au lieu d'une seule ou avec une antenne à la place d'une patte (Carroll et al. From DNA to diversity, 2001). Les gènes homéotiques chez la drosophile ou gènes *Hox* sont au nombre de huit et forment deux groupes : le groupe Antennapedia et le groupe Bithorax (Duboule and Morata, 1994) (Figure 45). Ils codent des facteurs de transcription à homéodomaine qui se lient sur une séquence consensus dans le promoteur de nombreux gènes cibles (Biggin and McGinnis, 1997).

Les gènes *Hox* de drosophile sont remarquablement conservés chez les vertébrés (Figure 45) et leurs fonctions dans la régionalisation du cerveau postérieur ont été bien décrites. Le cerveau postérieur, qui est composé de rhombomères, fournit l'innervation des muscles de la tête à travers un groupe de nerfs crâniens. Chaque rhombomère est à l'origine d'un unique groupe de neurones moteurs qui contrôle différents muscles de la tête.

Par exemple, les cellules progénitrices des rhombomères 2 et 3 contribuent aux neurones moteurs du nerf trijumeau qui innerve la mâchoire (Figure 46). Sans ces segments bien définis du cerveau embryonnaire, nous n'aurions pas le contrôle de plusieurs processus comme le sourire ou la mastication indiquant que la formation correcte de ces segments est très importante. Le patron d'expression des paralogues des gènes *Hox*, chez les vertébrés, coïncide avec les frontières des rhombomères et l'expression de ces gènes précède la formation des frontières morphologiques des rhombomères.

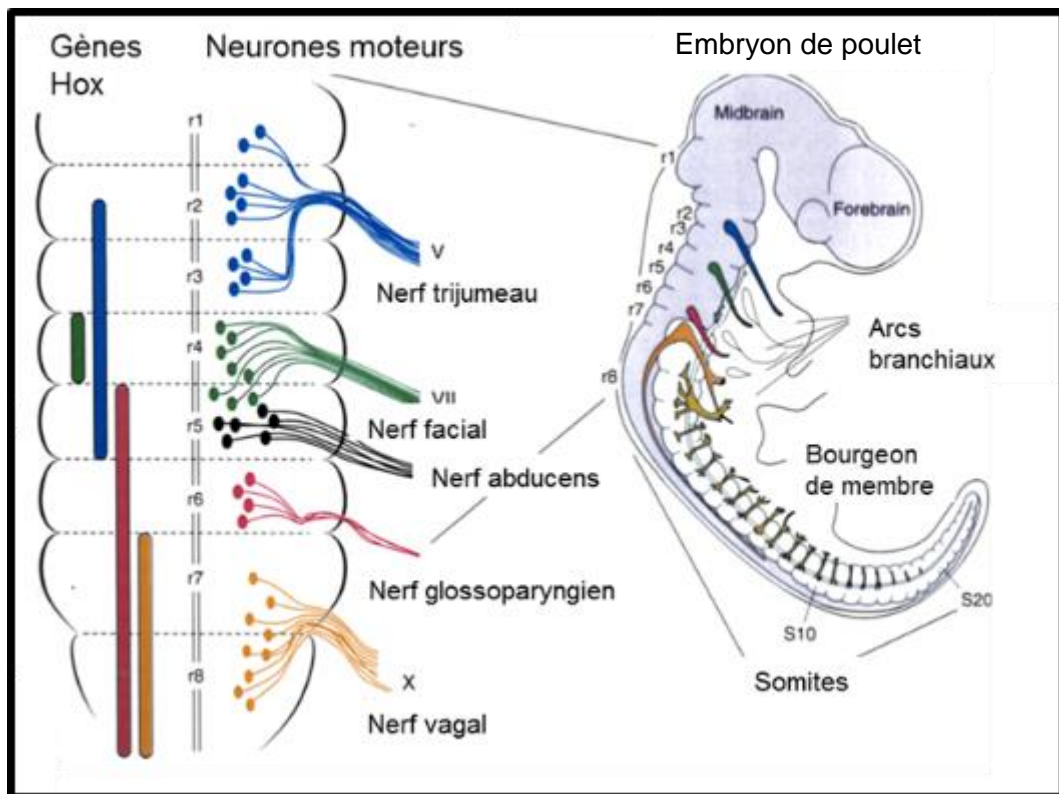


Figure 46 : Représentation schématique du cerveau postérieur.

(A) Les rhombomères (r) sont des unités répétées numérotées à partir de l'unité la plus antérieure, r1, juste postérieure au cerveau moyen, jusqu'à l'unité la plus postérieure, r7, à la jonction entre le cerveau postérieur et la moelle épinière. La segmentation dans cette région de l'embryon est aussi observée pour les nerfs crâniens, et les motoneurones qui envoient leurs axones à travers des points définis sur des rhombomères alternatifs. Par exemple, les motoneurones du nerf trijumeau sont générés à partir des rhombomères 2 et 3, alors que le nerf facial est issu du rhombomère 4.

(B) Représentation du cerveau postérieur et des différents nerfs crâniens dans un embryon de poulet de trois jours (D'après William A. Harris : Development of the Nervous System, Third Edition, 2012).

b. Implications des autres voies dans la régionalisation

De nombreux travaux montrent que la formation du cerveau antérieur des vertébrés dépend d'une combinaison de régulation inhibitrice des facteurs protéiques BMPs, Wnts et nodal (Niehrs, 1999). L'inhibition des facteurs BMPs induit du tissu neural antérieur, de type prosencéphale, mais pas de tissu postérieur tels que le mésencéphale et le rhombencéphale ou la moelle épinière (Harland, 2000). Nieuwkoop (1952) a proposé un mécanisme permettant la formation du tissu neural postérieur. Lors de la première étape, des signaux neuralisants induisent uniquement du tissu neural antérieur, puis un second signal convertit ce tissu neuralisé en tissu neural plus postérieur. Cette seconde étape est appelée étape de transformation. FGF, Wnt et l'acide rétinoïque sont impliqués dans le développement du système nerveux postérieur (Kudoh et al., 2002). Il a également été montré chez le xénope que la mise en place de l'axe antéro-postérieur de la plaque neurale était régulée par un gradient de signalisation Wnt/ β -caténine (Kiecker and Niehrs, 2001; Nordstrom et al., 2002).

c. La régionalisation dorso-ventrale

Le tube neural est également régionalisé selon un axe dorso-ventral. Dans la partie ventrale du tube neural, les neurones moteurs commencent à naître alors que dans la partie dorsale les neurones sensitifs vont se former. Les expériences de Holtfreter en 1934 ont démontré que la polarité dorso-ventrale du tube neural est dépendante de la notochorde, structure non neurale adjacente. La régionalisation dorso-ventrale du tube neural implique des signaux ventralisants produits par le mésoderme préchordal et la notochorde. Parmi ces signaux, sonic hedgehog (ou shh) est impliquée dans l'induction dorso-ventrale (Roelink et al., 1994). L'ajout de la protéine recombinante Shh à des explants de tube neural induit des tissus neuraux ventraux comme les neurones moteurs.

Le tube neural dorsal nécessite aussi la présence de signaux pour un développement normal. Avant la fermeture du tube neural, le futur côté dorsal est en continuité des cellules ectodermiques adjacentes. Les facteurs BMPs, en plus de leur fonction dans l'induction neurale, jouent là un rôle dans la spécification de la région dorsale du tube neural (Liem et al., 1995). Il a été montré qu'il existait un antagonisme

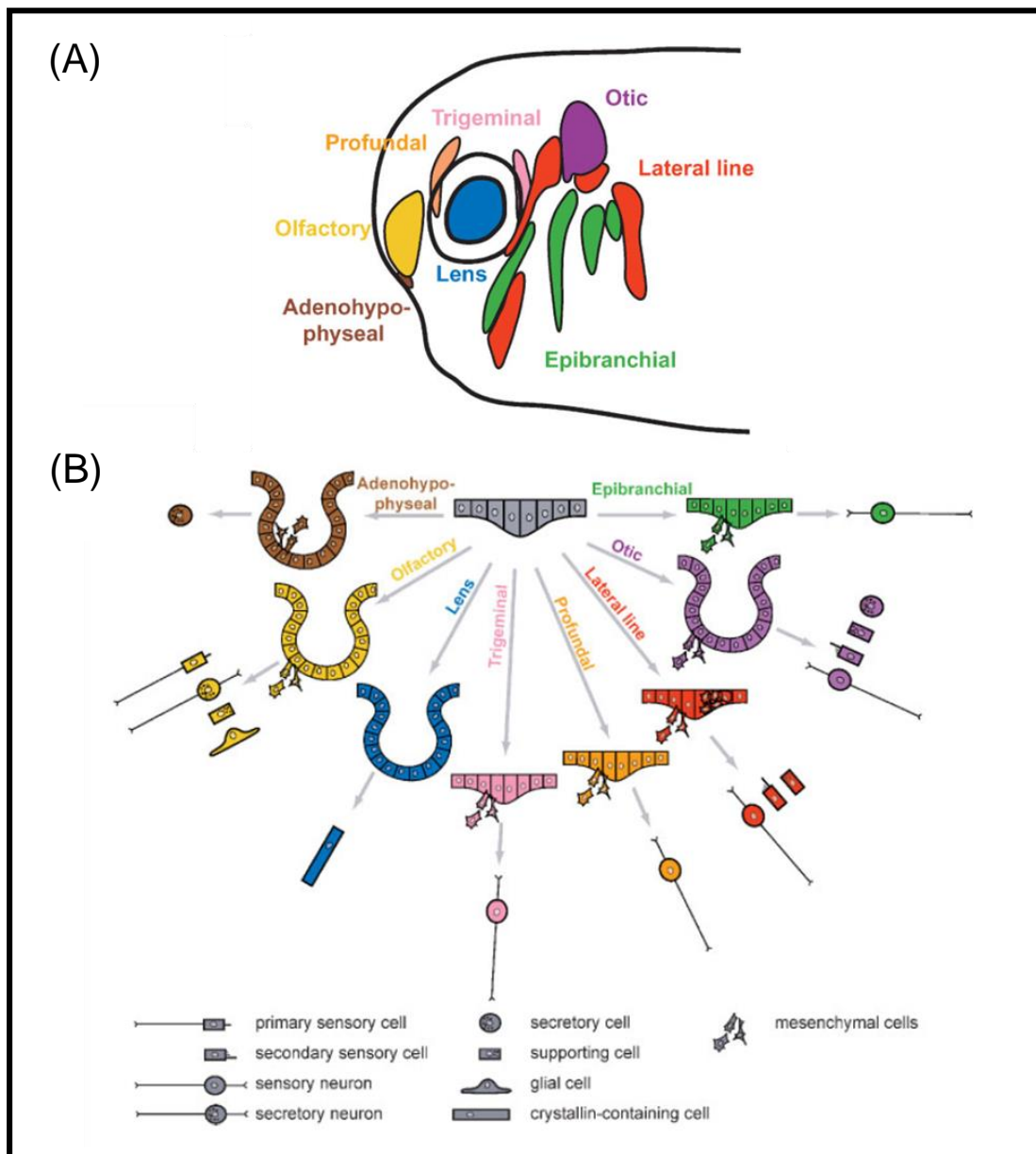


Figure 47 : Les placodes crâniennes des vertébrés.

(A) Représentation schématique des différents types de placodes ectodermiques comme elles sont distribuées dans un embryon de xénope de stade têtard.

(B) Résumé schématique de la morphogenèse et des dérivés cellulaires des diverses placodes ectodermiques. (D'après Schlosser 2006).

entre les signaux Shh issus du tube neural ventral et les signaux BMPs provenant du tube neural dorsal. En effet, quand BMP est ajouté le long d'explants en présence de Shh, la différenciation des neurones moteurs induite par Shh est bloquée.

4. Induction et spécifications des placodes

Lors de la gastrulation, l'ectoderme embryonnaire est divisé en plusieurs domaines qui auront des devenir différents. Il s'agit de la plaque neurale, la crête neurale, l'épiderme et l'ectoderme préplacodal. Les placodes ectodermiques correspondent à un épaissement de l'ectoderme non-neural dans la partie antérieure de la plaque neurale qui vont donner différents types cellulaires (Figure 47). On distingue plusieurs types de placodes : adénohypophysaire, olfactive, cristalline, trigéminal, épibranchiale, hypobranchiale, les placodes de la ligne latérale et les placodes otiques. Les placodes hypobranchiales ne sont présentes que chez l'amphibien alors que les autres placodes sont présentes chez tous les vertébrés. Toutes les placodes ont un devenir neurogénique à l'exception des placodes adénohypophysaires et cristallines (Schlosser, 2006).

Plusieurs facteurs de transcription sont exprimés dans les différentes placodes mais seuls les gènes de la famille *six* et *eya* sont exprimés dans l'ectoderme préplacodal et ce dès le début de sa formation. Les gènes *six* codent des facteurs de transcription à homéodomaine qui se lient directement à l'ADN. Ils peuvent agir comme activateurs mais aussi comme répresseurs transcriptionnels en fonction des co-facteurs avec lesquels ils interagissent. Les gènes *eya* codent des facteurs qui agissent comme des co-activateurs transcriptionnels des gènes *six*.

Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans la formation de l'ectoderme préplacodal. Tout d'abord, la voie de signalisation BMP permet la mise en place de l'ectoderme préplacodal. Une concentration graduelle en protéine BMP régionalise l'ectoderme en différents domaines, l'épiderme se forme à une concentration élevée de la protéine alors que la plaque neurale se forme à une concentration faible. L'ectoderme préplacodal se développe entre la crête neurale, qui se forme à des concentrations intermédiaires en protéine BMP, et l'épiderme, qui se forme également à des concentrations intermédiaires. L'injection d'ARNm codant un antagoniste de la protéine BMP tel que *Noggin*, induit l'expression du gène *six1* dans

les explants embryonnaires de xénope (Brugmann et al., 2004). La voie de signalisation de la protéine BMP doit donc être réduite dans l'ectoderme embryonnaire pour que l'expression des gènes dans l'ectoderme préplacodal soit possible. Il a également été démontré que la répression des voies de signalisation Wnt ou FGF étendait le domaine d'expression de *six1*, et inversement, l'activation de ces signaux diminuait son domaine d'expression (Brugmann et al., 2004). L'ectoderme préplacodal, au contraire de la crête neurale, se développe en absence de signaux postériorisants. Ceci permet d'expliquer pourquoi les placodes ne se retrouvent jamais dans le tronc et pourquoi la crête neurale ne se forme jamais dans la partie antérieure de la tête.

C. La neurogenèse post-embryonnaire et adulte

Le processus de neurogenèse cesse dans la plupart des régions du système nerveux chez la majorité des animaux. Les neurones sont des cellules différenciées et il n'y a pas d'exemples décrits de neurones fonctionnels qui reprennent le cycle mitotique. Cependant, il y a un remodelage intense du système nerveux des insectes lors de la métamorphose. Ce remodelage se produit à travers la mort cellulaire mais des nouveaux neurones sont aussi produits. Les amphibiens tels que le xénope passent aussi par un stade larvaire et un stade têtard où le corps grossit fortement avant la métamorphose. Pendant les stades larvaires, différentes régions de l'individu continuent à subir la neurogenèse de façon similaire à celle des stades embryonnaires. Au stade 46, une augmentation massive de la neurogenèse se produit dans la moelle épinière bien après la neurogenèse primaire (Schlosser, 2003; Schlosser et al., 2002). Cette seconde émergence majeure de neurones correspond à la neurogenèse secondaire et elle est observée aussi durant le développement du cerveau du poisson-zèbre (Mueller and Wullimann, 2003). Des études ont montré que l'activité de la protéine NeuroD était maintenue lors de la neurogenèse secondaire dans des embryons de xénope de stade 46 et dans certaines structures du cerveau chez l'adulte telles que les bulbes olfactifs, les aires préoptiques et l'hypothalamus, où l'ARNm est détecté dans les zones de prolifération (D'Amico et al., 2013). Le gène *NeuroD* est également exprimé dans l'hippocampe de la larve et de l'adulte. Cependant, dans ces régions les cellules qui expriment le gène sont dans un état post mitotique (D'Amico et

al., 2013). Dans les stades larvaires, l'expression du gène est exclue des cellules dans les zones de prolifération, en particulier des cellules mitotiques exprimant les gènes *Ngnr1* et *Delta* (Wullimann et al., 2005). Chez les mammifères, la neurogenèse adulte a été identifiée dans deux zones anatomiquement différentes qui produiront les neurones pour le bulbe olfactif : la zone subventriculaire (SVZ) dans le cerveau antérieur qui tapisse les ventricules latéraux et la zone subgranulaire (SGZ) de l'hippocampe (Zhao et al., 2008b). Il a également été montré que ces structures maintenaient des niveaux significatifs de l'ARNm *NeuroD* aux stades post-natal et adolescence chez la souris et l'homme (Lee et al., 2000; Roybon et al., 2009a; Roybon et al., 2009b). Les souris qui n'expriment pas le gène *NeuroD* montrent une malformation de l'hippocampe (Liu et al., 2000; Miyata et al., 1999). De plus, une surexpression du gène est suffisante pour favoriser la différenciation neuronale dans les progéniteurs neuraux de l'hippocampe chez l'adulte (Hsieh, 2012) alors que la délétion du gène entraîne une diminution de la survie et de la maturation des nouveaux neurones (Gao et al., 2009).

Un des exemples les mieux étudiés de la neurogenèse chez les animaux matures provient des études faites sur le chant des oiseaux. En fonction des saisons, la partie du cerveau responsable de la production du chant présentent de grandes différences (Nottebohm, 2002). Cette partie qui se trouve dans le télencéphale est deux fois plus volumineuse au printemps qu'à l'automne. De façon intéressante, la neurogenèse secondaire semble être plus abondante chez les oiseaux, les reptiles, les amphibiens et les poissons que chez les mammifères. Il est désormais établi que nous ne naissons pas avec tous les neurones nécessaires durant notre vie mais que certaines régions du cerveau comme l'hippocampe ou les aires olfactives continuent à produire de nouveaux neurones tout au long de la vie.

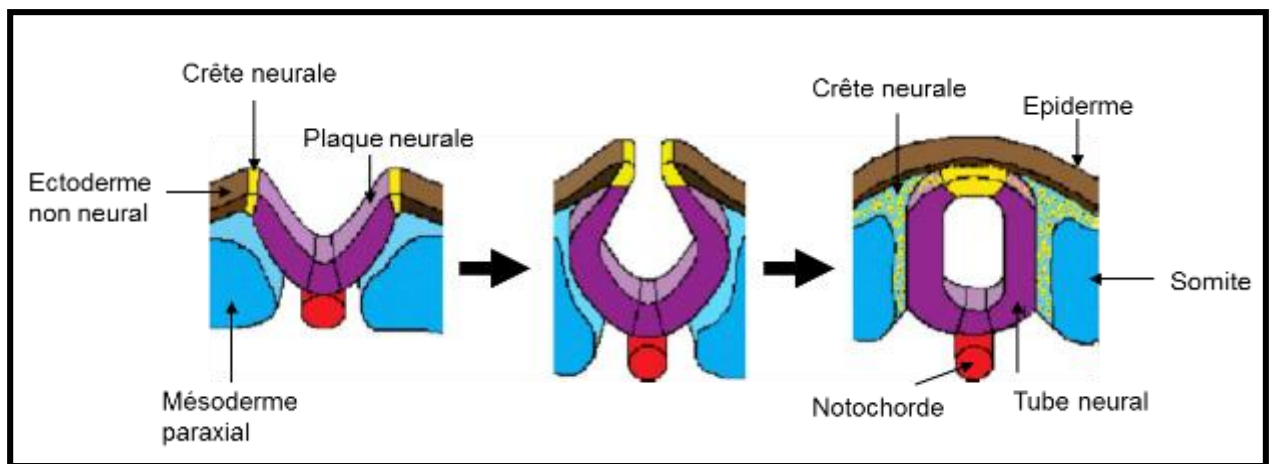


Figure 48 : La crête neurale est induite à la bordure de la plaque neurale.

Au début de la neurulation, la crête neurale est positionnée à la frontière entre la plaque neurale et l'ectoderme non neural. Quand le neuroectoderme se replie, la crête neurale est positionnée au niveau dorsal du tube neural. Chez la plupart des vertébrés, la délamination et la migration de la crête neurale commence lors de la fermeture du tube neural. (D'après (Huang and Saint-Jeannet, 2004).

V. Le développement de la crête neurale

La crête neurale constitue une population transitoire et migratoire de cellules qui participent à la formation d'un très grand nombre de tissus. Elle se forme dans la partie la plus dorsale du tube neural et a souvent été utilisée comme un indicateur de la différenciation dorsale du tube neural. Dans le tronc, la crête neurale est à l'origine des cellules du système nerveux périphérique incluant les neurones, la glie et les cellules de Schwann. Elles vont également donner les cellules pigmentaires et les cellules musculaires lisses (Huang and Saint-Jeannet, 2004). Au niveau des régions crâniennes, les cellules de la crête neurale contribuent à la formation de la majorité des structures de la tête.

A. Les mécanismes d'induction de la crête neurale

Les vertébrés se distinguent des autres deutérostomiens par un cerveau plus élaboré entouré d'un squelette cranio-facial et d'organes sensoriels tels que les yeux, le nez et les oreilles. Ces innovations proviennent de deux tissus embryonnaires : la crête neurale (ou CN) et les placodes (Meulemans and Bronner-Fraser, 2004; Schlosser, 2006). La crête neurale a été décrite pour la première fois par Wilhem His en 1868 dans des embryons de poulet comme « la corde entre » (Zwischenstrang), donnant naissance aux ganglions spinaux et crâniens. La crête neurale est une population de cellules multipotentes présentes transitoirement chez les embryons des vertébrés uniquement. Ces cellules naissent à la jonction de l'ectoderme non neural et de la plaque neurale au niveau du bourrelet neural. Lors de la fermeture du tube neural, les cellules de la crête neurale subissent une transition épithélium-mésenchyme qui leur permet de se délaminer du neuroépithélium et de migrer dans l'embryon selon des destins différents (Figure 48).

L'ectoderme est à l'origine de la plaque neurale, de la crête neurale, des placodes et de l'ectoderme non neural qui donneront naissance principalement au système nerveux central, périphérique et à l'épiderme. La spécification de la crête neurale est intimement liée à la formation de la plaque neurale et à son interaction avec l'ectoderme au moment de la neurulation.

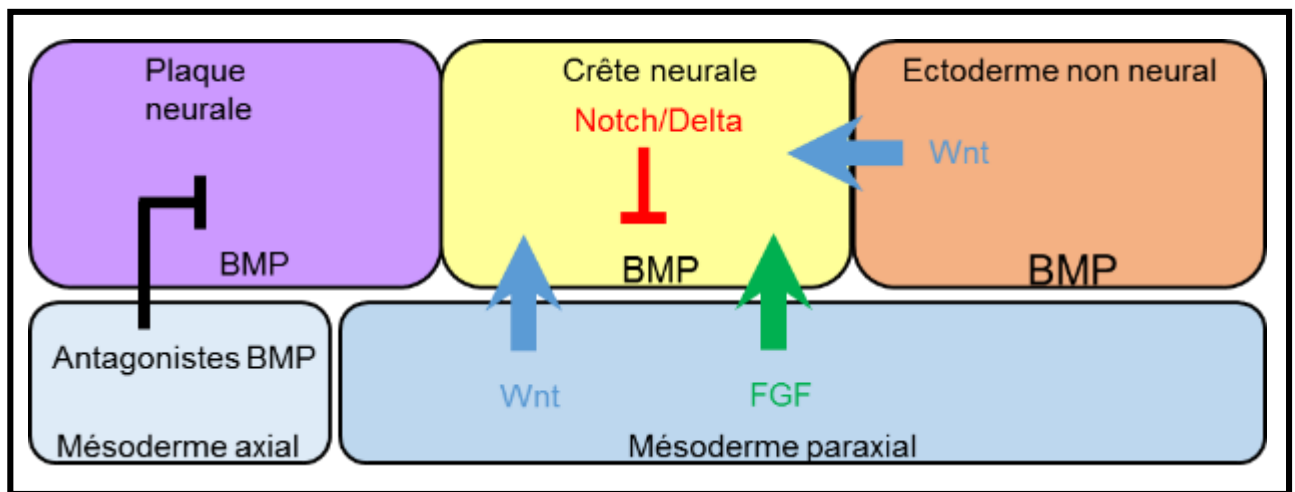


Figure 49 : Représentation schématique des signaux impliqués dans l'induction de la crête neurale à la frontière de la plaque neurale.

Les interactions entre la plaque neurale et l'épiderme environnant (BMP, Wnt et Notch/Delta) ainsi que les signaux dérivés du mésoderme paraxial sous-jacent (Wnt, FGF) sont connus pour être impliqués dans l'induction de la crête neurale. (D'après Huang and Saint-Jeannet, 2004).

Plusieurs études ont démontré que la crête neurale est induite à se former à partir du tube neural quand celui-ci est juxtaposé à l'épiderme. Lorsque les cellules du bourrelet neural sont marquées par fluorescence avant la fermeture du tube neural, elles peuvent donner naissance à la fois à des cellules de la crête neurale, du tube neural et de l'épiderme (Moury and Jacobson, 1990; Selleck and Bronner-Fraser, 1995).

Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans l'induction, la formation et le développement de la crête neurale chez les vertébrés comme les voies BMP, FGF et Wnt. Différents gènes, comme *Msx1* ou *Pax3*, répondent à ces signaux extracellulaires pour spécifier la bordure de la plaque neurale. Parmi les gènes exprimés spécifiquement dans les cellules de crête neurale, le facteur de transcription à doigt de zinc *Slug* (ou *snail2*) est devenu l'un des marqueurs les plus fiables des cellules des crêtes neurales pré-migratoires chez le poulet et les amphibiens.

1. Les sources des signaux d'induction

Dès son apparition au cours du développement embryonnaire, la crête neurale est en contact avec la plaque neurale, l'ectoderme voisin et le mésoderme sous-jacent qui formera les somites. Du fait de leur position relative par rapport à la crête neurale, chacun de ces trois feuillet est impliqué dans son induction (Figure 49). Des expériences de transplantation dans le modèle amphibien ont montré que le mésoderme paraxial peut induire l'ectoderme à former la crête neurale (Raven and Kloos, 1945). Plusieurs travaux ont également démontré le rôle potentiel du mésoderme dans l'induction de la crête neurale dans les modèles poulet et xénope (Bonstein et al., 1998; Marchant et al., 1998; Selleck and Bronner-Fraser, 1995). En revanche, chez le poisson-zèbre, des travaux suggèrent que le mésoderme paraxial n'est pas indispensable à l'induction de la crête neurale (Ragland and Raible, 2004).

L'interaction entre la plaque neurale et l'épithélium constitue également une autre source d'induction des cellules de crête neurale. Des expériences de transplantation d'épiderme ou de plaque neurale ont montré que les cellules de la crête neurale se formaient systématiquement à la frontière entre les tissus neuraux et non neuraux (Moury and Jacobson, 1989; Woo and Fraser, 1998).

Chez le poulet et le xénope, des greffes de plaque neurale dans l'ectoderme non neural adjacent induisent l'expression du gène *snail2* à la frontière entre ces deux tissus, et les cellules exprimant le gène sont issues à la fois de la greffe et du tissu hôte (Mancilla and Mayor, 1996; Selleck and Bronner-Fraser, 1995).

2. Les voies de signalisation extracellulaires

Comme nous l'avons évoqué précédemment, la signalisation par les protéines BMPs est nécessaire à la spécification dorsale du tube neural (Liem et al., 1995). Plusieurs études chez le xénope et le poisson-zèbre montrent qu'un gradient dorso-ventral des protéines BMPs est requis pour la formation de la crête neurale (LaBonne and Bronner-Fraser, 1998b; Nguyen et al., 1998). Une dose intermédiaire de signaux BMPs établit une zone de compétence en bordure de la plaque neurale, alors qu'une faible dose induit la formation de la plaque neurale et une forte dose de l'épiderme. Les signaux BMPs sont également importants à une étape plus tardive durant la neurulation pour assurer la maintenance de la crête neurale (Steventon et al., 2009). Chez le xénope, une augmentation de l'expression du gène *BMP4* dans la crête neurale est détectée au stade neurula (Tribulo et al., 2003). Ceci suggère que la diminution des signaux BMPs est tout d'abord nécessaire lors de l'étape initiale d'induction de la crête neurale tandis qu'une augmentation de ces signaux est requise durant l'étape de maintenance de celle-ci.

Plusieurs travaux indiquent que les voies de signalisation Wnt et FGF jouent aussi un rôle dans la spécification de la crête neurale (Deardorff et al., 2001; Garcia-Castro et al., 2002; Mayor et al., 1997). En effet, le traitement des explants de plaque neurale avec la protéine Wnt est suffisant pour induire des marqueurs des cellules de la crête neurale alors que le blocage de la signalisation Wnt par des inhibiteurs extracellulaires comme la protéine Dickkopf perturbe le développement de la crête neurale dans la région antérieure de la plaque neurale (Carmona-Fontaine et al., 2007; Garcia-Castro et al., 2002). En accord avec ces résultats, les récepteurs des ligands Wnts Frizzled 3 et 7, sont exprimés dans la région de la crête neurale et sont nécessaires à sa formation (Abu-Elmagd et al., 2006; Deardorff et al., 2001).

Chez la souris, l'inactivation au niveau dorsal du tube neural de la protéine β -caténine, effecteur principal de la signalisation Wnt, entraîne des défauts sévères dans la formation des dérivés de la crête neurale (Brault et al., 2001). Des travaux ont également montré l'implication des voies de signalisation Wnt et FGF dans la formation de la crête neurale chez le poulet, le poisson-zèbre et le xénope (Garcia-Castro et al., 2002; Kengaku and Okamoto, 1993; Lewis et al., 2004; Mayor et al., 1997). Le gène *FGF8* est exprimé dans le mésoderme paraxial au moment de l'induction de la crête neurale et il a été proposé comme source de ce signal (Monsoro-Burq et al., 2003). La présence des récepteurs aux protéines FGFs (FGFR) est détectée dans l'ectoderme lors des étapes de la formation de la crête neurale. FGFR4 est exprimé dans tout l'ectoderme au pôle animal pendant la gastrulation puis est ensuite exprimé en bordure de la plaque neurale au début de la neurulation (Golub et al., 2000; Hongo et al., 1999; Lea et al., 2009). Toutefois, un excès de protéine FGF inhibe le développement de la crête neurale suggérant que les signaux FGFs agissent de manière dose-dépendante (Hong and Saint-Jeannet, 2007). L'hypothèse que les voies FGFs et Wnts, agissent comme deuxième signal dans l'induction de la crête neurale, en combinaison avec une atténuation des signaux BMPs, reste controversée. Il a été proposé que les voies de signalisation FGFs et Wnts agissaient en parallèle, alors que d'autres travaux suggéraient que les signaux Wnts agissaient en aval de la voie FGF (Hong et al., 2008; Monsoro-Burq et al., 2005). Les signaux Wnts possèdent, comme les signaux BMP, des fonctions inductrices de la crête neurale mais aussi de maintenance lors de la neurulation chez le xénope (Steventon et al., 2009).

La voie de signalisation Notch intervient aussi dans le développement de la crête neurale chez le poisson-zèbre, le poulet et le xénope (Cornell and Eisen, 2005). Chez le xénope, l'activation de la voie Notch durant la gastrulation stimule la formation de la crête neurale tandis que son inhibition la bloque. Les effets de Notch sur la crête neurale pourraient être dus à la répression de la transcription du gène *BMP4* (Glavic et al., 2004). En revanche, chez le poulet, la perte de fonction et le gain de fonction des signaux Notch entraînent une inhibition de l'expression du gène, suggérant qu'une activité finement régulée de Notch est essentielle au maintien d'un niveau approprié des protéines BMPs dans la crête neurale (Endo et al., 2002).




























Famille de gènes	Gène	Plaque neurale	Crête neurale	Ectoderme non neural	S	P	X	PZ
<i>Msx</i>	<i>Msx1</i>				x	x	x	
	<i>Msx2</i>				x			
<i>Pax</i>	<i>Pax3</i>				x	x	x	x
	<i>Pax7</i>				x	x		x
<i>Snail</i>	<i>Snail</i>				x		x	x
	<i>Slug</i>					x	x	
<i>Sox</i>	<i>Sox8</i>				x	x	x	
	<i>Sox9</i>				x	x	x	x
	<i>Sox10</i>				x	x	x	x
<i>Zic</i>	<i>Zic1</i>				x	x	x	x
	<i>Zic2</i>				x	x	x	x
	<i>Zic3</i>				x		x	x
	<i>Zic5</i>							x
<i>Autres</i>	<i>Ap2α</i>				x	x	x	x
	<i>Ets-1</i>				x	x	x	
	<i>FoxD3</i>				x	x	x	x
	<i>Hairy2A</i>							x
	<i>Twist</i>				x	x	x	

Figure 50 : Expression des facteurs de transcription dans la crête neurale et les régions flanquantes.

Après l'induction de la crête neurale, l'expression des facteurs de transcription est limitée soit à la crête neurale (rouge), soit elle s'étend à l'ectoderme non neural (orange) ou la plaque neurale (violet). L'expression de ces gènes chez la souris (S), le poulet (P), le xénope (X) ou le poisson-zèbre (PZ) est indiquée lorsque les données sont disponibles. (D'après Huang and Saint-Jeannet, 2004).

3. Les gènes marqueurs de la bordure de la plaque neurale

En réponse aux signaux extracellulaires, la bordure de la plaque neurale est spécifiée par des gènes appelés « gènes de la bordure de la plaque neurale ». Chez le xénope, ces gènes sont exprimés dans l'ectoderme et sont répartis en deux sous-groupes qui possèdent des profils d'expression différents. Les gènes du premier sous-groupe sont exprimés dans l'ectoderme non neural et en bordure de la plaque neurale, les gènes du second sous-groupe sont exprimés dans la plaque neurale et en bordure de la plaque neurale (Figure 50) (Huang and Saint-Jeannet, 2004; Meulemans and Bronner-Fraser, 2004).

Le gène *Msx1* appartient au premier sous-groupe et code un facteur de transcription à homéodomaine, connu pour jouer un rôle dans les étapes précoces de la formation de la crête neurale et de l'épiderme (Monsoro-Burq et al., 2005; Suzuki et al., 1997; Tribulo et al., 2003). L'inhibition des gènes *Msx1* et *Msx2* chez la souris entraîne une malformation du squelette cranio-facial qui dérive de la crête neurale (Han et al., 2007). Chez le xénope, le gène *AP2α* est exprimé de manière identique au gène *Msx1* et code un facteur de transcription impliqué dans le développement de l'épiderme et de la crête neurale (Luo et al., 2003; Luo et al., 2001). Chez le poisson-zèbre, les mutants *AP2α* présentent une réduction de la crête neurale et des défauts dans certaines structures dérivées (Knight et al., 2003).

Les gènes *Pax* et *Zic* appartiennent au deuxième sous-groupe. Les gènes *Pax* codent des protéines possédant un domaine de liaison à l'ADN de type « paired box ». Le gène *Pax3* joue un rôle déterminant dans la spécification de la crête neurale chez le xénope (Hong and Saint-Jeannet, 2007; Monsoro-Burq et al., 2005; Sato et al., 2005). Chez les souris mutantes pour le gène, les dérivés des crêtes neurales comme les mélanocytes ou les ganglions périphériques présentent de nombreux défauts (Hornyak et al., 2001; Lang et al., 2000). Le gène *Pax7* est impliqué dans le développement de la crête neurale chez le poulet (Basch et al., 2006).

La famille des gènes *Zic* comprend cinq membres (*Zic1-5*) qui codent des facteurs de transcription à « doigt de zinc » (Houtmeyers et al., 2013). Chez le xénope, les gènes sont impliqués dans le développement de la crête neurale et exprimés le long de la bordure de la plaque neurale de l'embryon. La surexpression de ces gènes

active l'expression des gènes spécifiques de la crête neurale dans l'ectoderme (Fujimi et al., 2006; Kuo et al., 1998; Nakata et al., 2000; Nakata et al., 1997, 1998). Les gènes *Zic2* et *Zic5* sont essentiels pour le développement correct des dérivés de la crête neurale chez la souris (Elms et al., 2003; Inoue et al., 2004). Plusieurs études ont montré que l'expression simultanée des protéines Pax3 et Zic1 induite dans des explants de calotte animale de xénope activait la transcription d'un certain nombre de gènes cibles marqueurs de la crête neurale (Milet and Monsoro-Burq, 2014; Saint-Jeannet and Moody, 2014; Sato et al., 2005).

Le gène *Hairy 2*, qui code un facteur de transcription de type bHLH-O, peut réguler chez le xénope la formation de la crête neurale (Glavic et al., 2004; Nagatomo and Hashimoto, 2007). *Hairy2*, est exprimé maternellement et est présent dans tout l'ectoderme présomptif au stade blastula. De la fin de la gastrulation à la neurulation, les ARNm *Hairy2* sont détectés dans le plancher du tube neural et dans toute la bordure de la plaque neurale incluant les futures cellules de la crête neurale. Les homologues de *Hairy2* sont également exprimés dans la crête neurale en formation chez les autres vertébrés (Cornell and Eisen, 2005; Endo et al., 2002; Hatakeyama et al., 2006; Leve et al., 2001). Lorsqu'*Hairy2* est surexprimé dans l'embryon de xénope, il agit comme un effecteur de la voie Notch en activant son ligand *Delta1* et en réprimant l'expression du gène *BMP4* au niveau de la bordure de la plaque neurale, suggérant un rôle dans la formation de la crête neurale (Glavic et al., 2004; Nichane et al., 2008b). La protéine Hairy2 agit également en aval des voies de signalisation FGF et BMP pour maintenir les cellules dans un état indifférencié *via* une interaction avec la protéine bHLH Id3 (Nichane et al., 2008a).

SoxD, qui fait partie de la famille des gènes Sox (pour Sry-related HMG-box) est exprimé de façon précoce dans toute la plaque neurale et la bordure de la plaque neurale et est capable d'induire l'expression de gènes marqueurs de crête neurale dans le modèle d'explants de calottes animales de xénope (Mizuseki et al., 1998). Il a été montré que l'expression du gène *Msx1* est directement régulée par le gradient de BMPs dans l'embryon de xénope (Suzuki et al., 1997; Tribulo et al., 2003). De plus, l'expression de *Msx1* est requise en aval de la signalisation FGF alors que l'activité des signaux Wnts est dépendante de l'expression du gène *Pax3* (Monsoro-Burq et al., 2005). Il existe par ailleurs un élément de réponse aux signaux BMPs sur le promoteur du gène *Zic1* (Trobepe et al., 2006).

4. Les gènes spécifiques de la crête neurale

Un groupe de gènes, spécifiquement exprimés dans la région de la crête neurale, va être induit par la combinaison des facteurs décrits précédemment (Figure 50). Ces gènes codent des facteurs de transcription qui vont induire la détermination des cellules de la crête neurale au niveau de la bordure de la plaque neurale. Ces gènes vont ensuite activer l'expression de gènes dits effecteurs qui vont réguler le processus de transition-épithélium-mésenchyme, de migration et de différenciation des cellules de crête neurale.

Parmi ces gènes, la famille des gènes *Snail*, qui codent des facteurs de transcription à « doigt de zinc », a un rôle particulièrement important. *Snail2* est exprimé chez le xénope à partir du stade 12 dans les cellules de crête neurale et constitue un régulateur important de la spécification des cellules de crête neurale et de la transition épithélium-mésenchyme (Aybar et al., 2003; LaBonne and Bronner-Fraser, 2000; Mayor et al., 1997). Le promoteur du gène *Snail2* contient des sites de liaison pour le facteur Lef/ β -caténine indiquant qu'il peut être une cible directe de la voie Wnt canonique (Vallin et al., 2001). *Snail2* peut également coopérer avec le complexe répresseur Polycomb (PRC2) pour moduler le développement de la crête neurale (Tien et al., 2015). La surexpression de *Snail1* et *Snail2* entraîne la formation de cellules de la crête neurale chez le poulet (del Barrio and Nieto, 2002).

Le gène *FoxD3* appartient à la famille « Forkhead » et code un facteur de transcription à motif « winged helix » exprimé dans les cellules de crête neurale et jouant plusieurs rôles au cours de sa formation tant chez le xénope, le poulet que le poisson-zèbre (Kos et al., 2001; Sasai et al., 2001; Stewart et al., 2006). Les gènes Sox de la sous-famille SoxE constituent un autre groupe de gènes exprimés spécifiquement dans la crête neurale et qui sont importants pour son développement (Hong and Saint-Jeannet, 2005). Chez le xénope, plusieurs gènes de la famille Sox sont exprimés séquentiellement au cours du développement. Le gène *Sox8* est exprimé très précocement à partir du stade 11.5 suivi de l'expression du gène *Sox9* au stade 12 et de celle du gène *Sox10* plus tardivement au stade 14 lors de la neurulation.

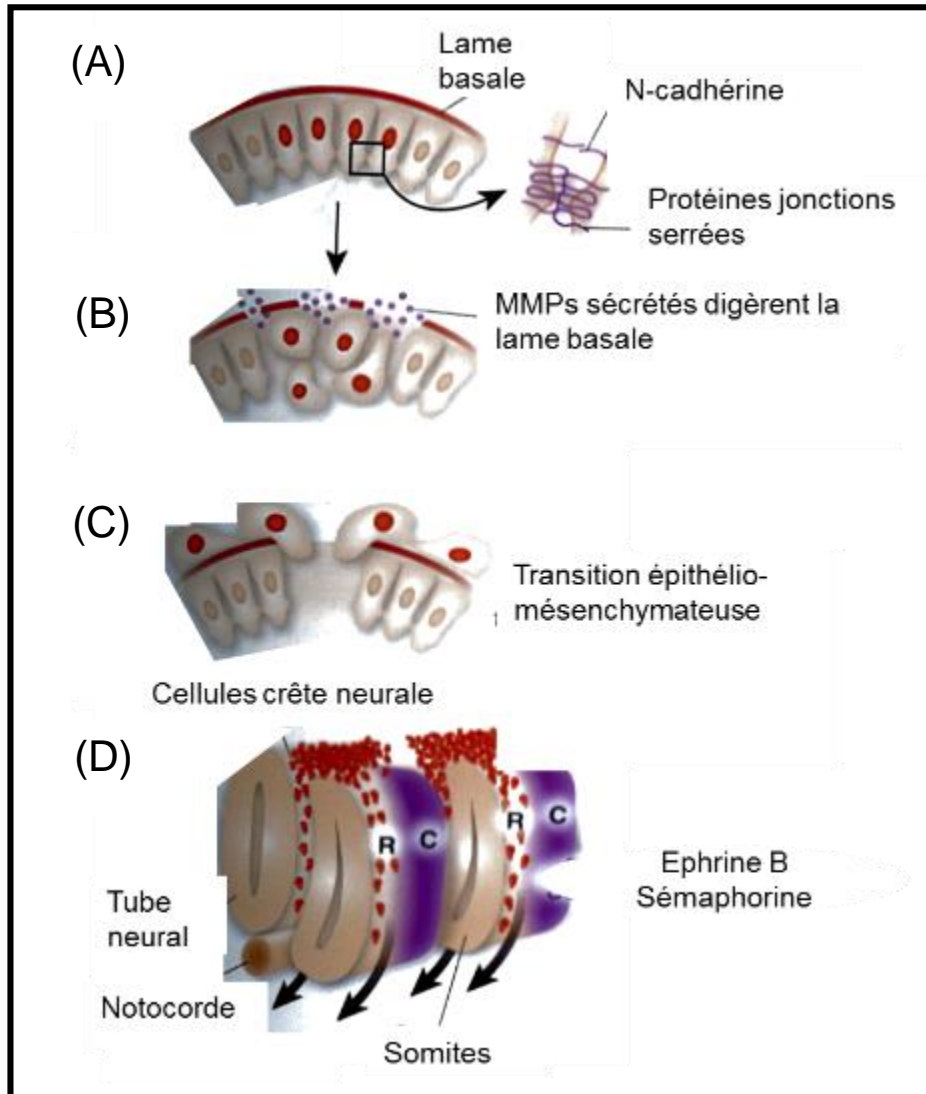


Figure 51 : Migration de la crête neurale.

(A) Les cellules de la crête neurale (noyau en rouge) sont situées dans la partie dorsale du tube neural et sont liées les unes aux autres et aux cellules voisines par des jonctions serrées et les protéines N-cadhérines.

(B) Les cellules expriment des facteurs de transcription tels que Slug et Twist qui vont entraîner une diminution de l'expression des protéines des jonctions serrées et des protéines d'adhésion cellulaire. Les cellules sécrètent des protéases (MMP) qui digèrent la lame basale recouvrant le tube neural.

(C) Les cellules terminent la transition épithélium-mésenchyme en s'échappant par les ouvertures créées dans la lame basale.

(D) Les cellules migrent dans des flux supportés par la matrice extracellulaire. Elles expriment les récepteurs Ephrine B et Sémaphorine et migrent dans la portion rostrale (R) des somites en évitant la partie caudale (C) où sont exprimés les ligands répulsifs Ephrine et sémaphorine. (D'après William A. Harris Development of the Nervous System, Third edition, 2012).

Plusieurs études ont montré l'importance de ces gènes pour le développement de la crête neurale. L'inhibition du gène *Sox8* provoque un retard dans la formation des cellules progénitrices de la crête neurale entraînant des conséquences dramatiques pour la différenciation des différents dérivés de la crête neurale (O'Donnell et al., 2006). Les gènes *Sox9* et *Sox10* sont impliqués dans la formation des cellules progénitrices de la crête neurale et le gène *Sox9* régule aussi le processus de délamination des cellules (Aoki et al., 2003; Cheung and Briscoe, 2003; Lee et al., 2004; Spokony et al., 2002). Chez le poisson-zèbre, l'inhibition du gène *Sox9* bloque la spécification de la crête neurale (Yan et al., 2005).

B. La migration de la crête neurale

Après les étapes d'induction et de spécification, la population des cellules de crête neurale quitte son territoire d'origine *via* un processus de délamination. Ce processus repose sur une transition épithélium-mésenchyme (ou TEM pour **T**ransition **E**pithelium **M**esenchyme) qui est régulée par un réseau complexe de facteurs de transcription. Les cellules perdent leur morphologie de type neuroépithéliale et acquièrent des capacités migratoires caractéristiques des cellules mésenchymateuses. Leur migration s'effectue alors en suivant une vague antéro-postérieure.

1. La transition épithélium-mésenchyme

Durant le processus de transition épithélium-mésenchyme, les cellules de la crête neurale perdent leurs propriétés d'adhésion cellulaires, conférées par les jonctions serrées, et leur polarité apico-basale. Ceci a lieu dès que les cellules deviennent compétentes pour répondre aux signaux inducteurs de la TEM. La protéine principale des jonctions serrées est l'Occludine et son expression est fortement diminuée dans les cellules avant leur migration. La TEM s'accompagne d'une modification du répertoire des protéines d'adhésion exprimé par les cellules (Figure 51).

Les cellules cessent d'exprimer les protéines NCAM (pour **N**eural **C**ell **A**dhesion **M**olecule), N-cadhérine et cadhérine 6B, et *a contrario* expriment les cadhérines 7 et 11 (Cheung and Briscoe, 2003; Cheung et al., 2005; Dottori et al., 2001; McKeown et al., 2005; Nakagawa and Takeichi, 1995). Un réseau de gènes régulateurs similaires a été établi pour la spécification de la crête neurale dans toutes les espèces étudiées (Milet and Monsoro-Burq, 2012). Le processus de TEM implique l'expression de métalloprotéases (ou MMPs) qui vont dégrader la membrane basale et la matrice extracellulaire environnante pour permettre aux cellules de la crête neurale de se délaminer de la couche épithéliale. Les cellules vont alors acquérir des propriétés invasives et migrer à travers la matrice extracellulaire (Thiery et al., 2009). Les gènes de la famille *Snail* sont des régulateurs de la TEM. En effet, chez la souris les gènes *Snail1* et *Snail2* inhibent l'expression de la protéine E-cadhérine, qui est impliquée dans les interactions entre cellules épithéliales (Cano et al., 2000). Chez le poulet, le gène *snail2* réprime l'expression du gène *cadherine 6B* dans la crête neurale en se liant à son promoteur (Taneyhill et al., 2007). *Twist*, un autre facteur de transcription de type bHLH est exprimé dans les cellules de crête neurale et réprime l'expression de la protéine E-cadherine (Soo et al., 2002; Yang et al., 2004). Les études ont montré que les protéines Snail pouvaient activer *in vitro* l'expression des métalloprotéases *MMP2*, *MMP3* et *MMP9* (Jorda et al., 2005; Kuphal et al., 2005). Chez le xénope, les MMPs de la famille ADAM ont été identifiées comme importantes pour la migration des cellules de la crête neurale (Alfandari et al., 2001; McCusker et al., 2009). D'autres molécules telles que les GTPases RhoA sont impliquées dans le contrôle de la dynamique des microtubules durant la TEM (Nakaya et al., 2008). Une fois que les cellules ont quitté le tube neural, elles vont commencer à migrer en suivant des chemins très stéréotypés et conservés chez les vertébrés.

2. La migration des cellules de la crête neurale

La migration des cellules de la crête neurale s'effectue en deux vagues, une vague précoce segmentée et une vague tardive uniforme. Plusieurs composants de la matrice extracellulaire comme le collagène, la laminine et la fibronectine sont connus pour servir de soutien à la migration des cellules.

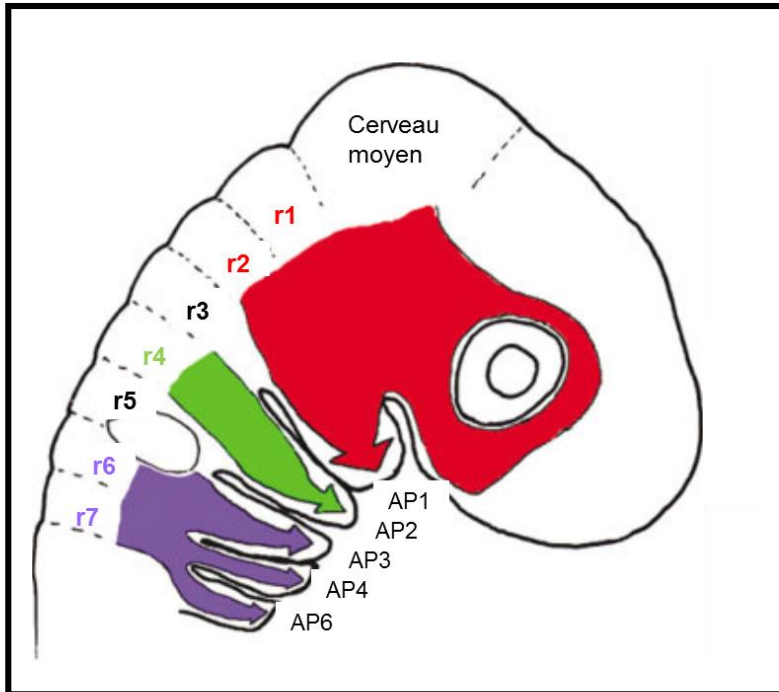


Figure 52 : Les cellules de la crête neurale céphalique migrent selon trois courants.

Le courant trigéminal (rouge) est issu du cerveau moyen et des rhombomères (r) 1 et 2. Il migre dans la mâchoire supérieure, sous l'œil et dans l'arc pharyngien (AP) 1 qui forme la mâchoire inférieure. Le courant hyoïde (vert) est issu du rhombomère 4 et migre dans le deuxième arc pharyngien. Le courant post-otique (violet) émerge des rhombomères 6 et 7 et remplit les arcs pharyngiens au nombre de 3. (D'après (Graham et al., 2004).

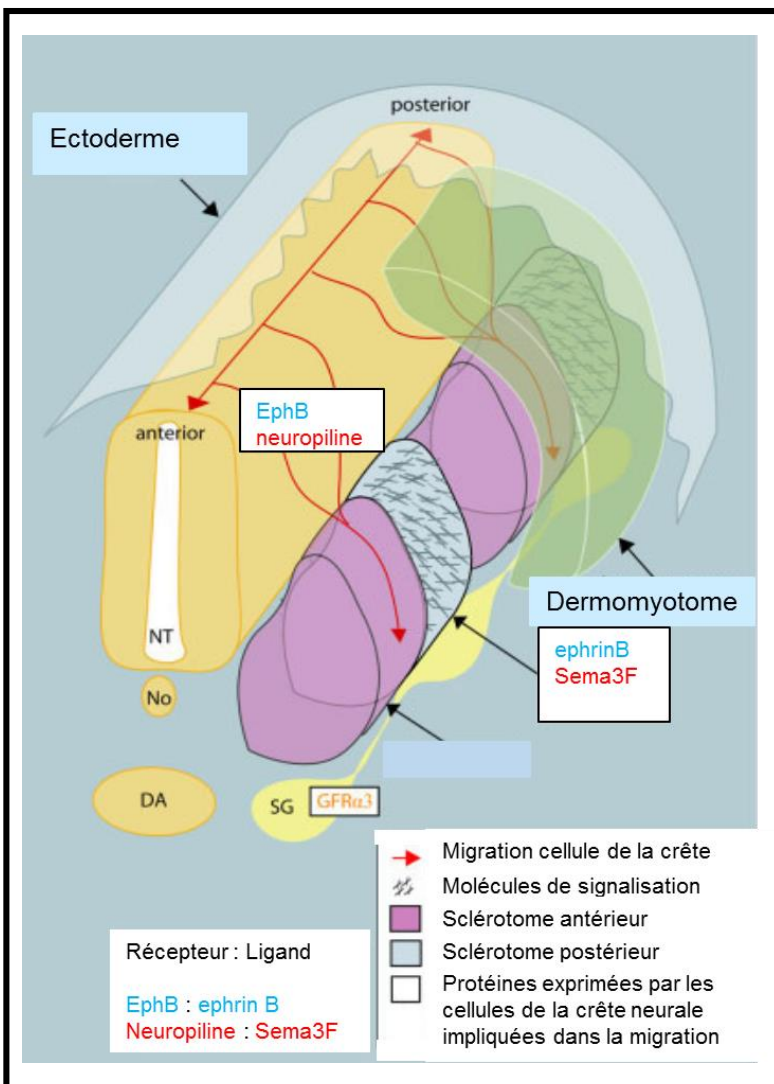


Figure 53 : Migration ventro-médiale des cellules de la crête neurale troncale.

Lors de la migration des cellules de la crête neurale (flèche rouge), plusieurs molécules du sclérotome postérieur bloquent l'invasion des cellules de la crête neurale dans cette portion des somites et établissent un profil métamérique du ganglion de la racine dorsale. Ventralement, les cellules de la crête neurale expriment le récepteur EphB et le récepteur neuropiline. Elles ne peuvent pas accéder au sclérotome postérieur à cause de l'expression de leurs ligands, ephrinB et Sema3F respectivement. NT : Tube neural, No : notochorde, DA, aorte dorsale, SG, ganglion sympathique. (D'après (Harris and Erickson, 2007).

On distingue deux types de crête neurale, en fonction de la position antéro-postérieure par rapport à l'axe neural et en fonction du comportement de migration et de différenciation des cellules qui la composent. On distingue ainsi la crête neurale céphalique au niveau de la tête de l'embryon, et la crête neurale troncale dans la partie postérieure.

a. La crête neurale céphalique

Au niveau de la tête de l'embryon, les cellules de la crête neurale migrent dans un environnement dépourvu de somites le long de la mandibule, l'hyoïde et les arcs branchiaux. Les premières cellules qui migrent suivent une voie ventro-latérale et colonisent les arcs pharyngiens où elles vont générer les os, le cartilage et le tissu connectif de la face. Les cellules qui migrent plus tardivement restent près du tube neural et donnent naissance aux neurones et aux cellules gliales des ganglions crâniens. Le cerveau postérieur de l'embryon est segmenté en rhombomères et les cellules migrent selon trois courants qui se calquent sur ces rhombomères. Le premier courant, ou courant trigéminal, émane du cerveau moyen et des rhombomères 1 et 2 ; le courant hyoïde est issu du rhombomère 4 et le courant post-otique des rhombomères 6 et 7 (Figure 52). La migration des cellules fait intervenir de nombreux régulateurs dont les éphrines et leurs récepteurs Eph et la sémaphorine de classe 3 et ses récepteurs les neuropilines. Les cellules de la crête neurale céphalique chez la souris, le xénope et le poulet expriment différentes combinaisons d'éphrines et de leurs récepteurs (Adams et al., 2001; Baker and Antin, 2003; Davy et al., 2004; Helbling et al., 1998; Mellott and Burke, 2008; Smith et al., 1997). Le récepteur aux neurorégulines ErbB4 est exprimé au niveau du rhombomère 3 et est impliqué dans la segmentation de la crête neurale céphalique (Golding et al., 2004; Golding et al., 2000).

b. La crête neurale troncale

Lorsque les cellules quittent le tube neural dans la partie troncale de l'embryon, les premières structures qu'elles rencontrent sont les somites. Les cellules qui migrent suivent une voie ventro-médiale et passent à travers la moitié antérieure du sclérotome (partie des somites qui donnera le squelette axial) de chaque somite. Une partie de ces cellules migrent jusqu'à proximité de la notocorde et génère les neurones et les cellules gliales des ganglions sympathiques. Le reste des cellules s'arrête au niveau antérieur du sclérotome et donne naissance aux neurones sensoriels et aux cellules gliales des ganglions de la racine dorsale (Figure 53).

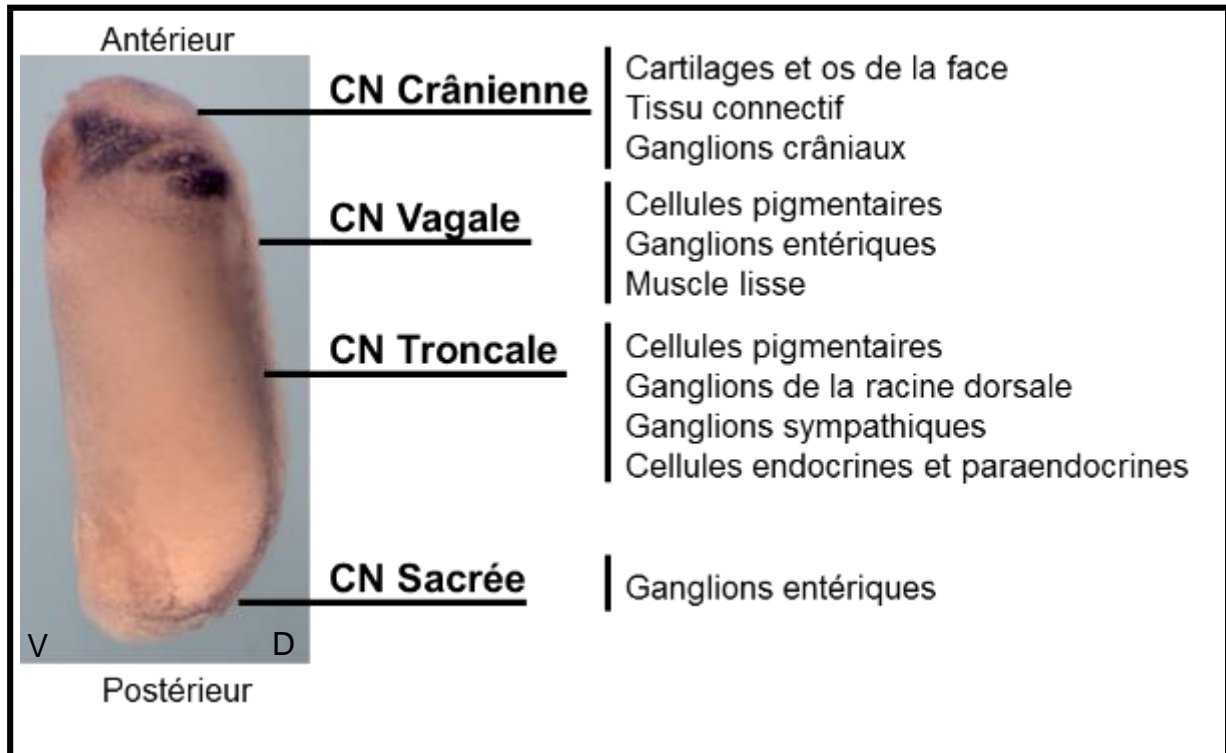


Figure 54 : La crête neurale est à l'origine d'une grande variété de types cellulaires.

L'expression du gène *twist* dans un embryon de xénope de stade 25 révélé par hybridation *in situ* est restreinte aux CN crâniennes. Les subdivisions de la crête neurale en fonction de la position par rapport à l'axe antéropostérieur sont indiquées ainsi que des exemples de leurs dérivés. D, dorsal ; V, ventral.

Une seconde vague de cellules migre plus tardivement, en suivant une voie dorso-latérale entre le dermomyotome des somites et l'ectoderme. Ces cellules donnent naissance aux mélanocytes. Les éphrines jouent un rôle important dans ces vagues de migration, tant chez la souris que chez le poulet (Baker and Antin, 2003; De Bellard et al., 2002; Krull et al., 1997; Santiago and Erickson, 2002; Wang and Anderson, 1997).

3. Les dérivés des cellules de la crête neurale

Il existe un lien important entre la migration des cellules de crête neurale et leur différenciation. La majorité des cellules commence leur migration dans un état peu ou pas différencié et leur différenciation a lieu lorsqu'elles ont atteint leur destination. Les cellules des crêtes neurales sont à l'origine de multiples dérivés tissulaires qui diffèrent selon la position des cellules par rapport à l'axe neural. On distingue, en fonction de leur position antéro-postérieure, quatre types de cellules de crêtes neurales, céphalique (ou crânienne), vagale, troncale et sacrée. Les cellules céphaliques vont donner les cartilages et les os de la face, le tissu connectif et les ganglions crâniens. Les cellules vagues seront à l'origine des cellules pigmentaires, des ganglions entériques et du muscle lisse. Les cellules troncales donneront les cellules pigmentaires, les ganglions de la racine dorsale, les ganglions sympathiques et les cellules endocrines et paraendocrines. Enfin, les cellules sacrées sont à l'origine des ganglions entériques (Figure 54).

C. Crête neurale et pathologies

Les cellules des crêtes neurales et les cellules des tumeurs malignes présentent de fortes similitudes en terme d'expression de gènes et de comportement cellulaire (Kuriyama and Mayor, 2008; Nieto, 2009; Thiery et al., 2009). Les cellules de la crête neurale étant à l'origine de nombreux tissus, toute perturbation de leur développement peut avoir de graves conséquences et parfois être responsable de tumeurs malignes.

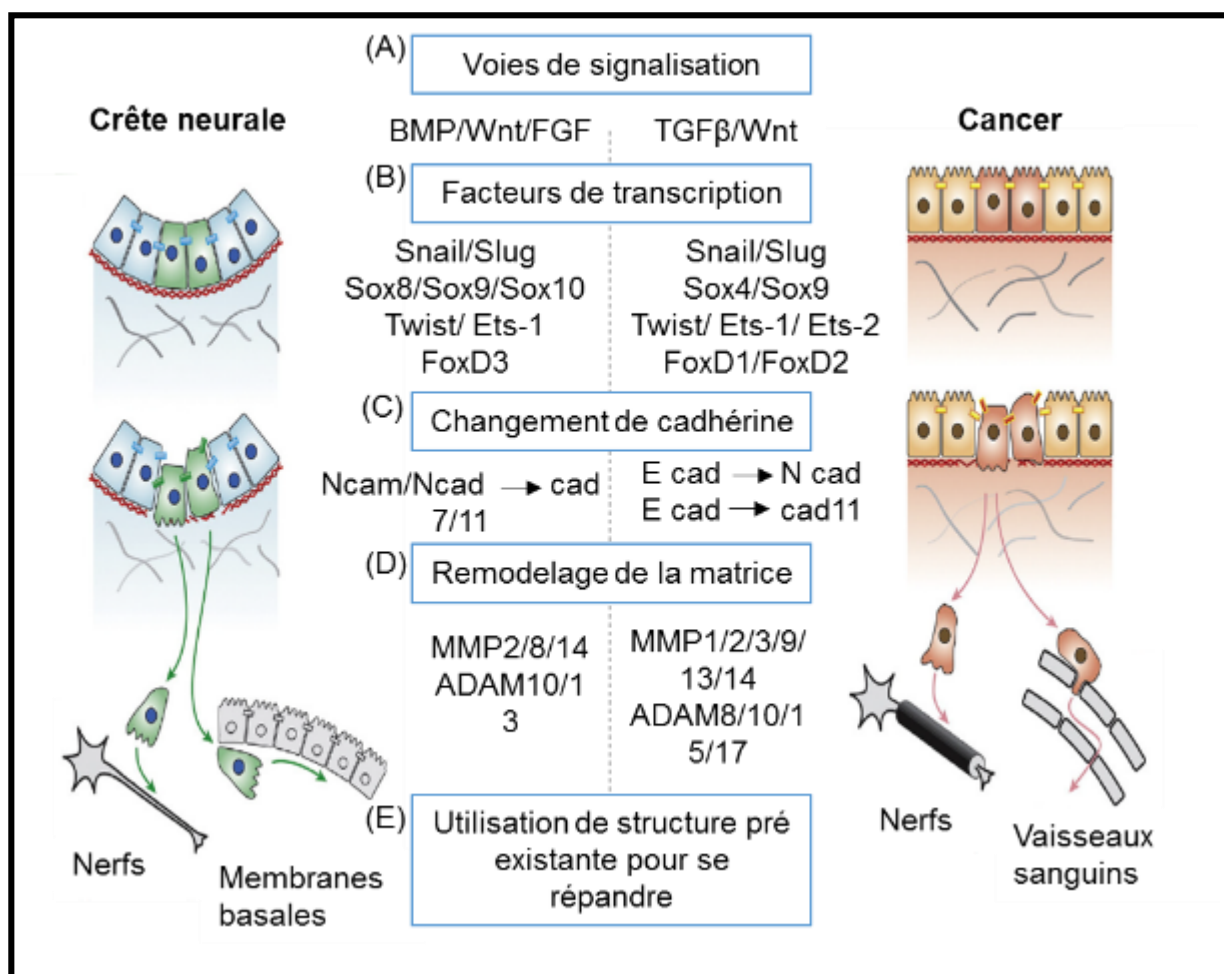


Figure 55 : Les cellules de la crête neurale migrent de façon similaire aux cellules cancéreuses métastatiques.

(A) Les cellules de la crête neurale pré-migratoire et les cellules cancéreuses présentent des niveaux élevés des voies de signalisation TGFβ/BMP, Wnt et FGF.

(B) Ces voies de signalisation induisent l'expression de différentes familles de facteurs de transcription telles que Snail, Sox, Twist et Ets qui stimulent la transition épithélium-mésenchyme.

(C) Les changements de propriétés d'adhésion cellulaire pendant la transition épithélium-mésenchyme, permet aux cellules de la crête neurale et aux cellules cancéreuses de se séparer de leur tissu d'origine.

(D) Les cellules expriment différentes protéinases des familles MMP et ADAM qui contribuent à la modification des propriétés d'adhésion cellulaire en favorisant le remodelage de la matrice extracellulaire et la perte des molécules de surface telles que les cadhérines.

(E) Les cellules tumorales migrent de façon solitaire ou collective et utilisent des structures préexistantes telles que les nerfs et la membrane basale pour les cellules de la crête neurale ou les nerfs et les vaisseaux sanguins pour les cellules tumorales. (D'après (Theveneau and Mayor, 2012)).

Les mélanomes, gliomes, neuroblastomes et phéochromocytomes ainsi que des pathologies complexes telles que le syndrome de Waardenburg-shah, de DiGeorge, la maladie de Hirschsprung ou la dysplasie frontonasale sont des exemples de dysfonctionnements reliés aux cellules de la crête neurale. Les chercheurs ont montré que plusieurs facteurs impliqués dans la formation de la crête neurale présentent un dysfonctionnement dans certains cancers (Heeg-Truesdell and LaBonne, 2006; Thiery et al., 2009). Par exemple, les souris mutantes pour les gènes *Pax3* et *Sox10* constituent des modèles pour l'étude du syndrome de Waardenburg et la maladie de Hirschsprung (Parisi and Kapur, 2000).

Dans les cancers métastatiques, les cellules cancéreuses primaires se disséminent dans tout l'organisme *via* le système circulatoire pour aller former des tumeurs secondaires ou métastases. Les cellules cancéreuses métastatiques ont des caractéristiques analogues de celles des cellules de la crête neurale (TEM, délamination, migration) et des mutations dans les gènes *Snail1* et *Twist* ont été identifiées dans de nombreux types de cellules cancéreuses humaines (Kuphal et al., 2005; Kuriyama and Mayor, 2008; Yang et al., 2004).

Les cellules cancéreuses présentent souvent des niveaux élevés d'expression des facteurs Wnt, FGF, TGF β ou BMP qui sont reminiscents des signaux impliqués dans l'induction de la crête neurale et la transition épithélium mésenchyme (Figure 55) (Thiery and Sleeman, 2006)). Les facteurs de transcription *Snail*, *Twist*, *SoxE* et *FoxD*, qui sont induits par les différentes voies de signalisation durant la formation de la crête neurale ont leur expression augmentée dans de nombreux cancers (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005; Dittmer, 2003; Dong et al., 2004; Hsu et al., 2004; Seth and Watson, 2005; Turner et al., 2007; Wallerand et al., 2010). Ce cocktail de facteurs de transcription permet aux cellules cancéreuses d'acquérir la capacité à effectuer la transition épithélium-mésenchyme suggérant que ce processus pourrait être la première étape de la cascade métastatique.

De plus, les cellules tumorales expriment tout un cocktail de protéines type MMPs et ADAMs qui leur confèrent la capacité de digérer les composants de la matrice extracellulaire et les molécules de surface cellulaire telles que les cadhérines (Egeblad and Werb, 2002; Murphy, 2008; Overall and Kleinfeld, 2006; Page-McCaw et al., 2007).

Or, l'expression des protéines MMPs et ADAMs est souvent associée à un fort potentiel invasif et à un mauvais pronostic en termes de survie au cancer et leur activité est essentielle à la délamination et la migration cellulaire (Alfandari et al., 2001; Duong and Erickson, 2004; McCusker et al., 2009; Murphy, 2008; Page-McCaw et al., 2007; Shoval et al., 2007). Les cellules cancéreuses et les cellules de crête neurale présentent des similitudes quant à leur mode de migration (solitaire et collective) après avoir effectué la TEM (Deisboeck and Couzin, 2009; Friedl and Gilmour, 2009; Friedl and Wolf, 2010; Khalil and Friedl, 2010; Mayor and Carmona-Fontaine, 2010; Rorth, 2009; Theveneau and Mayor, 2011; Wolf et al., 2007).

Les régulateurs négatifs de la migration des cellules de la crête neurale (telle que la sémaphorine) peuvent agir comme des suppresseurs de tumeurs et il est maintenant admis que les différentes stratégies de migration cellulaire observées dans le cancer rappellent celles de migration observées durant le développement embryonnaire (Mayor and Carmona-Fontaine, 2010; Neufeld and Kessler, 2008). Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires qui président à la formation des cellules de crête neurale, leur différenciation et leur migration représente une étape importante dans la compréhension des propriétés invasives des cancers métastatiques. La crête neurale constitue un modèle de choix pour étudier les différents mécanismes régulant la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire, pouvant conduire à terme à des thérapies ciblées pour le traitement de certains cancers.

Objectifs de thèse

L'objectif de ma thèse a été de définir quels étaient les rôles des gènes *vestigial-like 3* (ou *vgll3*) et *vestigial-like 4* (ou *vgll4*) au cours du développement embryonnaire avec comme modèle d'étude l'amphibien xénope. Le gène *vestigial* a été décrit pour la première fois chez la drosophile et il est essentiel à la formation des ailes. Il code une protéine qui agit comme cofacteur de transcription en se liant aux protéines de la famille TEAD qui possèdent un domaine TEA de liaison à l'ADN. Le gène *vestigial* de drosophile constitue le membre fondateur d'une famille de gènes qui comporte chez l'homme quatre orthologues, nommés *VESTIGIAL-LIKE 1-4* (ou *VGLL 1-4*).

A l'origine de mon sujet de thèse, il y a les travaux de l'équipe dans laquelle j'ai effectué ma recherche et qui a montré que les protéines TEAD régulaient le gène *α -tropomyosine* dans les trois lignages musculaires durant le développement embryonnaire du xénope (Pasquet et al., 2006). L'équipe a caractérisé les gènes *tead* et la famille des gènes *vestigial-like* de xénope et étudié leur expression (Fauchaux et al., 2010; Naye et al., 2007). L'équipe a montré que les quatre gènes *vestigial-like* amphibien, homologues des gènes mammifères, présentaient des profils d'expression distincts suggérant une fonction spécifique pour chacun d'eux au cours du développement embryonnaire. *Vgll1* est exprimé dans l'épiderme et *vgll2* dans le muscle alors que *vgll3* possède une expression très restreinte au niveau du rhombomère 2 du cerveau postérieur. *Vgll4* est le seul gène de la famille qui possède une expression dans plusieurs territoires de l'embryon comme le cerveau, les yeux, les arcs branchiaux, le tube neural, le muscle et l'épiderme.

Bien que le gène *vestigial* ait été décrit et particulièrement bien étudié chez la drosophile, il existe encore très peu de données sur le rôle des gènes *vestigial-like* chez les vertébrés et sur leur fonction durant le développement. Au préalable aux études fonctionnelles, j'ai complété, par une analyse *in silico*, les données de la littérature, établissant à ce jour la première revue qui décrit la famille des gènes *vestigial* dans les différents clades en termes de nombre, de structure et de fonctions. Ceci m'a permis de proposer un modèle schématisant le nombre et la composition des gènes *vestigial* au cours de l'évolution des formes animales.

En termes d'analyse fonctionnelle, je me suis plus particulièrement attaché durant mes travaux à l'étude fonctionnelle des gènes *vgl/3* et *vgl/4* avec comme modèle l'embryon de xénope qui possède plusieurs avantages qui en font un modèle de choix pour cette étude.

J'ai utilisé des approches de gain de fonction et de perte de fonction pour démontrer que les gènes *vgl/3* et *vgl/4* avaient une fonction importante dans les processus de neurogenèse et dans la formation et la migration des cellules de la crête neurale. Ces travaux constituent la première description du rôle de ces gènes durant le développement et fournissent un cadre conceptuel qui doit permettre d'appréhender non seulement leur fonction dans d'autres espèces mais aussi leur implication potentielle dans les pathologies humaines dans lesquelles ils ont été décrits.

Résultats

Chapitre 1 : *Vestigial-like-4* régule la neurogenèse et la formation des cellules de la crête neurale

Résumé des travaux

Mes travaux sur la fonction de *vestigial-like 4* (*vgll4*) dans le modèle xénope sont présentés dans l'article en préparation qui suit. Les travaux antérieurs du laboratoire ont décrit la situation de la famille des gènes *vgll* chez le xénope. Le gène *vgll4*, à la différence des trois autres gènes (*vgll1-3*), est exprimé de manière maternelle et dans différents tissus embryonnaires tels que le cerveau, le tube neural, la crête neurale, les somites et l'épiderme (Fauchaux et al. 2010). Nous avons exploré les fonctions de *vgll4* lors du développement embryonnaire et plus particulièrement lors de la neurogenèse et la formation des crêtes neurales chez xénope.

Nous avons utilisé dans nos travaux les stratégies de perte de fonction et gain de fonction. Nos résultats indiquent que *vgll4* régule les étapes précoces de la neurogenèse. La surexpression et l'inhibition de *vgll4* entraînent une diminution de l'expression de différents marqueurs de la neurogenèse comme *N-tubuline*, *engrailed 2*, *krox20*, *pax6* mais aussi du facteur proneural bHLH *neurogénine*. Ceci suggère un rôle de *vgll4* dans le neurectoderme. En revanche, *vgll4* ne semble pas être impliqué dans la formation du mésoderme ni de l'endoderme dont les marqueurs respectifs *xbra* et *sox17* ne sont pas affectés. Concernant les processus cellulaires, *vgll4* n'entraîne pas une augmentation de l'apoptose ni un défaut de prolifération et il serait alors impliqué dans la détermination ou la différenciation neurale.

Vgll4 est également exprimé dans la crête neurale, structure transitoire spécifique des vertébrés et constituée d'une population de cellules multipotentes. La crête neurale est à l'origine de nombreux dérivés comme les mélanocytes, le cartilage et les os de la tête, les neurones périphérique et la glie.

Nous avons analysé la fonction de *vgll4* dans la formation de la crête neurale grâce aux mêmes stratégies utilisées lors de l'étude de la neurogenèse. Les expériences perte de fonction entraînent une diminution de l'expression des

marqueurs spécifiques de la crête neurale tels que *snail2* et *sox9*. On observe aussi une diminution de l'expression de *pax3* situé en amont dans le réseau de gènes qui orchestre la formation de la crête neurale. En conséquence, l'absence de *vgll4* dans les embryons conduit à un défaut de formation du cartilage de la tête. Ce phénotype est spécifique de l'absence de la protéine *vgll4* car la co-injection de l'ARNm *vgll4* avec le morpholino *vgll4* permet le sauvetage du phénotype. La surexpression de *vgll4* dans l'embryon entraîne l'expression ectopique de *pax3*.

Les protéines vestigial-like ne possèdent pas de domaine de liaison à l'ADN et doivent interagir avec des facteurs de transcription pour exercer leur fonction. Les principaux facteurs de transcription connus pour interagir avec les protéines vestigial-like sont les protéines Tead. Par co-immunoprécipitation, nous avons mis en évidence que *vgll4* est capable d'interagir avec Tead1 et Tead2. Les embryons morphants *tead1* et *tead2* ont le même phénotype que les morphants *vgll4*. Les protéines *vgll4* délétées ou mutées sur leur domaine d'interaction avec *tead* sont toujours capables d'activer *pax3*.

Ceci suggère que *vgll4* pourrait interagir avec d'autres partenaires que *tead*. L'ensemble de ces travaux a permis d'établir pour la première fois que *vgll4* était un acteur essentiel de la neurogenèse précoce et de la formation des cellules de la crête neurale lors du développement embryonnaire du xénope.

Article 1

VESTIGIAL-LIKE 4 regulates neurogenesis and neural crest cells formation

Emilie Simon ^{1,2}, Corinne Faucheux ^{1,2}, Sandrine Fédou ^{1,2}, Nadine Thézé ^{1,2, #} and Pierre Thiébaud ^{1,2, #}

¹ Univ. Bordeaux, F-33076, Bordeaux, France

² CNRS, UMR 5164, F-33076 Bordeaux, France

Note: Co-senior authors

KEYWORDS: Vestigial-like, *Xenopus*, TEAD, neurogenesis, cranial neural crest

ABSTRACT

Vestigial-like (vgll) proteins belong to a family of cofactors that have in common a highly conserved domain, called Tondu, which mediates their interaction with the transcription factors TEAD family. In vertebrates, there are four *Vestigial-like* genes (or *vgll1-4*). *Vgll1-3* are homolog to *Drosophila Vestigial* and contain a single Tondu domain while *Vgll4* is homolog to the recently described *Tgi* and have two Tondu domains. In vertebrates, *vgll1-3* are expressed in restricted tissues while *vgll4* is ubiquitously expressed in all tissues. Although *Vgll4* has been showed to be able to inhibit TEAD/YAP-mediated transcription downstream of hippo signaling pathway, nothing is known about its function during vertebrate development. Here we describe experiments addressing *vgll4* functions in the *Xenopus* model. We demonstrate that *vgll4* is required at an early step of neurogenesis and regulates neural crest cell formation upstream of *pax3* and *zic1*. We further show that although *vgll4* interacts with both *tead1* and *tead2* in the embryo, it still has the ability to activate *pax3* even when the two Tondu domains are mutated. Together these findings unveil unexpected functions for *vgll4* that will be of valuable assistance in the search for its role in other vertebrate.

INTRODUCTION

The vestigial-like (VGLL) family of proteins takes its name from the founding member vestigial (Vg), first characterized in *Drosophila melanogaster*. In *Drosophila*, vestigial gene (*vg*) is required for the formation of wing and can induce wing-outgrowths on other structures (Halder et al., 1998; Kim et al., 1996). Vestigial is a nuclear protein that lacks a nucleic acid domain but form a transcriptional activator complex with the protein Scalloped (Sd), a member of the TEAD family of transcription factors. The complex Vg/Sd regulates wing identity and activates a set of genes involved in wing morphogenesis (Guss et al., 2001). The first identified vertebrate homolog of Vestigial is the mammalian protein named TONDU (Vaudin et al., 1999). TONDU has been now renamed VESTIGIAL-LIKE 1 (or VGLL1) and is a 258 amino acid protein whose homology with the *Drosophila* protein spans a 24 amino acid region, or Tondu domain (or Tdu), that mediates the interaction with TEAD proteins. Since then, several *Vestigial-like* genes have been identified in vertebrate and they that have all in common to possess a Tondu domain (TDU) (Bonnet et al., 2009; Chen et al., 2004b; Faucheux et al., 2010; Maeda et al., 2002a; Mielcarek et al., 2002b; Mielcarek et al., 2009). This domain is very ancient and has been identified not only in bilateria but also in cnidaria, porifera and in unicellular filasterean species, indicating a premetazoan origin for the gene family (Koontz et al., 2013). The picture we have now is that Vestigial like proteins fall into two subfamilies. The first one corresponds to vertebrate proteins Vgll1, Vgll2 or Vgll3 that, like *Drosophila* Vestigial, have a single TDU domain. The second subfamily corresponds to proteins that contain two TDU domains like Vgll4 in vertebrate or its *Drosophila* homolog Tgi (Simon et al., 2015). An additional Vgll4 protein, named Vgll4L, has been described in zebrafish and *Xenopus* (Barrionuevo et al., 2014). The protein has only 30-40% identity with Vgll4, except over the TDU domains. The absence of Vgll4L genes in chicken, mouse or human suggests that they are homeologs that have evolved from a duplication event in the shared lineage to fishes and amphibians. The Tondu domain is the signature of Vestigial-like family proteins and is essential to their interaction with TEAD proteins (Vaudin et al., 1999). Outside it, the proteins show little or no homology. In the subfamily Vgll1-3/Vg, the unique Tondu domain TDU, is 24 amino acids long, while in the Vgll4/Tgi subfamily, the two Tondu domains (TDU1 and TDU2) are 10 amino acids long and are highly conserved from sponges to mammals. Because TDU1 and TDU2 are found early in

evolution before the appearance of TDU in bilaterians, they may be considered as the ancestral Tondu domain and constitute the basic evolutionary unit of Vgll proteins (Simon et al., 2015).

Although a wealth of data has been generated about the function of Vestigial in *Drosophila* since its description, the roles played by vertebrate orthologs have been little explored to date. Vestigial has been categorized as a selector protein that promote wing development and the regulation of wing-specific gene expression through its interaction with Scalloped (Halder et al., 1998; Kim et al., 1996; Mann and Carroll, 2002; Paumard-Rigal et al., 1998; Simmonds et al., 1998). Vg has also been shown to regulate muscle development and differentiation in *Drosophila*, and this property might necessitate its interaction with the key myogenic factor Dmef2 (Bernard et al., 2003; Deng et al., 2010; Sudarsan et al., 2001). This property seems to be an evolutionarily conserved trait, as mammalian Vgll2 has been found to be an essential cofactor of TEAD being able to stimulate muscle differentiation induced by MyoD or interact with MEF2 to activate MEF2-dependent promoters (Gunther et al., 2004; Maeda et al., 2002a). Vgll2 function has also been investigated in zebrafish embryo where a morpholino-based knock-down analysis revealed it is required for the survival of the pharyngeal endoderm, and play a role in the development of the neural crest cell-derived craniofacial skeleton (Johnson et al., 2011). Human VGLL4, the first protein identified with two Tondu domains has been showed to regulates α -1 adrenergic dependent gene expression (Chen et al., 2004b); In these experiments, VGLL4 was found to be a negative regulator of both α -1 adrenergic and skeletal actin promoter transcription mediated by TEAD1 (Chen et al., 2004b). More recently, findings from several studies shed new light on the function of VGLL4. Tgi, the *Drosophila* homolog of human VGLL4, contains two tondu domain and has been characterized in screens seeking genes that regulate the Hippo pathway or aiming to identify new Sd partners (Guo et al., 2013; Koontz et al., 2013). Tgi stands for **T**ondu-domain-containing **g**rowth inhibitor and accordingly, it was demonstrated to act as a repressor of the Hippo pathway by direct binding to Sd, thus inhibiting the transcriptional activation of the Sd-Yki complex (Guo et al., 2013; Koontz et al., 2013). Human VGLL4 can phenocopy Tgi-dependent suppression of tissue overgrowth when overexpressed in *Drosophila* and antagonize the Hippo pathway in a transgenic mouse model of hepatocellular carcinoma induced by YAP (mammalian Yorkie ortholog) overexpression (Koontz et

al., 2013). Since these findings, several reports have confirmed the anti-oncogenic functions of VGLL4 in various models (Jiao et al., 2014; Li et al., 2015a; Zhang et al., 2014a). Despite these works, nothing is known about Vgll4 functions during development. We have previously characterized the two *tead* genes and the four *vgll4* genes in *Xenopus* (Faucheux et al., 2010; Naye et al., 2007). The *vgll* genes have a very distinct pattern of expression during development and in adult tissues that yet display similarities with the expression patterns observed among the mammalian and non-mammalian vertebrate orthologues. We have showed that *Vgll4* is the only gene of the family that is maternally expressed with a broad pattern that encompass neural plate and extend to presumptive neural crest (Barrionuevo et al., 2014; Faucheux et al., 2010).

Here, we have used gain and loss of function strategies in *Xenopus* model to address *vgll4* functions during neurogenesis and neural crest formation. We show that loss of *vgll4* expression impairs early neural development and neural crest formation. Neurogenin-dependent neural differentiation requires *vgll4* and the expression of *pax3*, a major regulator of neural crest development, is regulated by *vgll4*. We show that *vgll4* can interact with *tead* proteins in the embryo but mutational analysis reveals that *vgll4* functions is not strictly dependent on its Tondu domain. Altogether, our results demonstrate that *vgll4* regulate different pathways during early development and lend important regulatory insights into a factor that has key roles in neural development and neural crest formation.

MATERIALS AND METHODS

Ethics Statement

This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the European Community. The protocol was approved by the “Comité d’éthique en expérimentation de Bordeaux» N° 33011005-A.

Plasmid constructions

Vgll4-LA was generated by polymerase chain reaction (PCR) and cloned in pCS2HA vector. *Vgll4-LB* was obtained by 5’RACE and was cloned in pCS2-HA. *Vgll4-S* was obtained by RT-PCR from embryo and cloned in pCS2HA. All *vgll4* deleted forms were obtained by PCR and cloned in pCS2HA. The *V4mutTDU* construct was obtained with the Q5 Site-Directed Mutagenesis (Biolabs) which enables site-specific mutagenesis in double stranded plasmid DNA according to the manufacturer’s instructions. *Tead1-myc* and *tead2-myc* constructs were obtained by sub-cloning original clones in pCS2-Myc vector.

Xenopus embryo injections, embryo treatment, and explant cultures

Xenopus laevis embryos were obtained as described before (Treguer et al., 2013). Embryos were staged according to Nieuwkoop and Faber tables (Nieuwkoop and Faber, 1975). *Vgll4* (0.1-1 ng), *vgll4mutTDU* (1 ng), *vgll4Δ145N* (1 ng), *vgll4Δ190C* (1 ng), *tead1* (c-myc tag, 50 pg) and *tead2* (c-myc tag, 50 pg) mRNAs were synthesized *in vitro* by using the Message Machine kit (Ambion, Austin, TX). For knockdown experiments, morpholino (Mo) antisense oligonucleotide was supplied by GeneTools Ins., as follows, *vgll4* MO (V4Mo): GGAGATGCGGCCCCGGTAACAAAAG mismatch morpholino (MM Mo); GGACATCCGCCCCCGCTAAAAAG *tead1* MO (T1MO): CTCCAAGTCTCGGCTCCATGATTG, *tead2* MO (T2MO): AGGGTAAGGAGAGGCTCCTCCAAGC, *control* MO (cMO): CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA.

We determined in preliminary experiments the effective doses for the microinjection experiments corresponding to 1 ng *vgll4A* mRNA and 10 ng to 15 ng of *vll4* Mo respectively. For rescue experiments, 1 ng of *vgll4A* mRNA encoding a non targeted mRNA were co-injected with the Mos. 250pg of *β-galactosidase* mRNA were used as tracer and the injection were performed into one blastomere at either 2-cell stage or 4-cell stage embryos. For animal cap assay, both blastomeres of two-cell stage embryos

were injected into the animal pole region. Animal caps were then dissected from early stage 9-10 injected embryos and cultured until appropriate stages before RNA extraction. Animal cap assay and RT-PCR analysis were performed as previously described (Naye et al., 2007) with the following oligonucleotides:

Vgll4-LA F, ATTGGTTCACGCAGATGACG; R, ACGTAATCACAGAAGGTCTG

Vgll4-LB F, GCTCAACTACCAGTATCTGC; R, CACGTAATCACAGAAGGTCTG

Vgll4-SA F, GAATCTCTCGGGAAGACTCG; R, CACGTAATCACAGAAGGTCTG

Whole mount in situ hybridization and immunostaining

Whole-mount *in situ* hybridization was carried out with full length anti-sense probes labelled with digoxigenin corresponding to indicated gene sequences and visualized with BM purple staining (Boehringer) (Harland, 1991). To generate antisense probes, plasmids were linearized and transcribed as follows : pBSKS-en2, BamHI/T3 ; Hairy2A, SalI/T7 ; pGEMT-krox20, EcoRI/T7 ; pBSKS-neurogenin, BamHI/T3 ; pBSKS-n-tubulin, NcoI/T3 ; DH105-pax3, SalI/T7 ; pCS2R-pax6, BglII/T7 ; p27^{xic}, SalI/T7 ; pCS107-slug, SalI/T7 ; pBSKS-sox2, XbaI/T7 ; pGEMT-sox9, NcoI/Sp6 ; pBSKS-sox17, SmaI/T7 ; pBSKS-twist, HindIII/T7 ; pSp73-xbra, BglII/T7 ; pGEMT-xk81, BamHI/T7 ; pCS2-zic1, EcoRI/T3. *Pax3* and *zic1* probes were a gift of Dr. Monsoro-Burck.

For immunostaining, embryos were collected and fixed in MEMFA for 1 hr at RT. Antibody staining was performed following the standard procedures for indirect immunostaining (Sive et al., 2000) using phosphohistone H3 antibody at 1:1000 dilution (Milipore), a secondary antibody anti rabbit IgG at 1:500 coupled with alkaline phosphatase and diaminobenzidine for detection (Sigma). Embryos were bleached in 2-3% hydrogen peroxide, 5% formamide, and 1 x SSC.

Western Blot

Once stage of development reached, embryos were lysed directly in cold RIPA buffer (PBS, 1% triton, 1% NP40, 0.05% SDS, 1 µg/ml protease inhibitor cocktail (Roche), 1 mM Pefabloc, 20 mM NaF, 1 mM Na vanadate), sonicated and centrifuged 10 min at 10000 rpm. Subsequently, Freon (1,1,2-trichlorotrifluoroethane, Sigma-Aldrich) was used to remove the yolk from the samples, which were then boiled for 5 min and stored at -80°C. Proteins extracted from the equivalent of one embryo were loaded on 12% SDS-PAGE and transferred on nitrocellulose membranes. Proteins were reacted with

the antibodies [mouse anti-HA (Covance, clone 16B12, 1/1000), mouse anti-c-myc tag (Sigma, 1/7000) mouse anti-GFP (1/5000)] as recommended by the manufacturers. The blots were then probed with HRP-conjugated secondary antibodies goat anti-mouse were incubated to visualize staining using the enhanced chemiluminescence detection kit (GE Healthcare).

***In vitro* translation**

500 ng of in vitro transcribed mRNA were translated in Promega lysate reticulocyte according to the manufacturer instructions in the presence of 40 ng or 400 ng of Mos and methionine ³⁵S. The reaction products were analyzed onto a 12% SDS-PAGE followed by autoradiography.

Alcian Blue staining

Stage 47 larvae were fixed in MEMFA 1 h at RT and dehydrated in 100% ethanol. Fixed embryos were incubated in acidic alcohol (80% ethanol, 20% acetic acid) containing 0.05% Alcian blue (Sigma, St Louis, MO, USA) for 3 days and then washed in 95% ethanol for 15 min. Embryos were rehydrated using 75% to 25% ethanol mixed with 2% potassium hydroxide (KOH) and washed in 2% KOH. Embryos were transferred into 2% KOH containing progressive increase of glycerol (20%-60%) for 1h each and finally washed in 80% glycerol in 2% KOH overnight at RT. The embryos were dissected to show cartilage structure in head.

Whole-Mount TUNEL Assays

The whole-mount TUNEL staining protocol was carried out following the protocol as previously described (Hensey and Gautier, 1997). Briefly, embryos were fixed in MEMFA (100 mM Mops, pH7.4, 2 mM EGTA, 1 mM MgSO₄, 4% formaldehyde), and stored in methanol at -20°C. Embryos were rehydrated in PBT (0.2% Tween 20 in PBS), washed in PBS, and incubated in 150U/ml terminal deoxynucleotidyltransferase (Roche), and 0.5 μM digoxigenin-dUTP (Roche). The reaction was terminated in PBS/1mM EDTA, at 65°C, followed by washes in PBS. Detection and chromogenic reaction was carried out according to Harland (1991). The embryos were blocked in PBT + 20% goat serum, followed by incubation with anti-digoxigenin antibody coupled with alkaline phosphatase (Roche). Embryos were washed in PBS and staining developed using nitro blue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate substrates. The reaction was visible within 30 min, and embryos were viewed following dehydration in methanol.

Immunoprecipitation

Embryos were injected in both blastomeres of two-cell stage embryos into the animal pole region. Once stage of development reached, 20-30 injected embryos were frozen on dry ice prior to lysis in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40 together with 1 mM PMSF and a proteinase inhibitor cocktail (Roche). Solubilized proteins were pre-cleared with protein A sepharose beads (Sigma) and incubated with appropriate antibodies (2 µg) [mouse anti-HA (Covance, clone 16B12) or mouse anti-c-myc tag (Sigma)] for 1 h at 4°C and then incubated with protein A sepharose beads for 1h at 4°C. Agarose beads were spun and washed in cold lysis buffer several times, then boiled in SDS sample buffer before loading onto 10% SDS-PAGE gels. Proteins were immunoblotted and stained with anti-c-myc (1/7000) or anti-HA (1/1000) antibodies. Bound antibodies were detected with HRP-conjugated secondary antibodies (EasyBlot kit anti-mouse IgG; Gene Tex) diluted at 1/1000 in EasyBlocker solution (Gene Tex) to minimize background from protein A contamination, and visualized using the enhanced chemiluminescence detection kit (GE Healthcare).

Luciferase activity measurement

Embryos were injected with *tead1*, *yap* and *vgl14* and two plasmids: pGL284LUC (a 5'-flanking 284 pb fragment of the α -tropomyosin promoter was cloned upstream to a luciferase reporter gene in pGL3-basic) and pRL-TK used for normalization. Animal cap were dissected from stage 9 embryos and frizzled in liquid nitrogen few hours later. Dissection were lysed in lysis buffer (Dual Luciferase Kit, Promega). Luciferase activity was determined from 10µl of the supernatant, according to the manufacturer's instructions, and quantified with a Varioskan® Flash (Thermo Fisher Scientific). Relative firefly luciferase activity (RLU) was normalized with Renilla luciferase activity in dissections lysates.

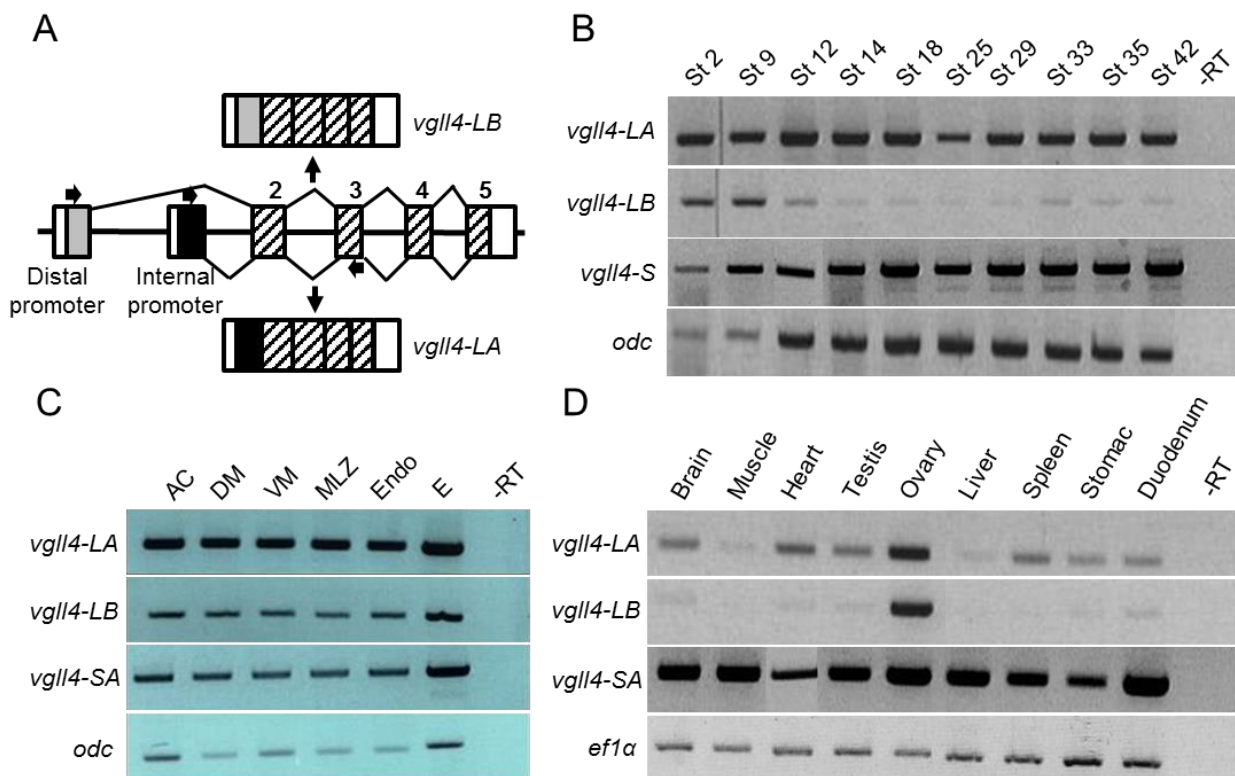


Fig.1. *Xenopus vgll4* expression in development and adult tissues.

(A) Schematic representation of the *vgll4* gene structure and isoforms produced. RT-PCR analysis of *vgll4* expression. Arrows indicate the position of the primers used for PCR. (B) Temporal expression in different developmental stages (St). RT-PCR analysis on stage 10.5 dissected embryo; AC, animal cap ; DM, dorsal mesoderm ; VM, ventral mesoderm ; MLZ, marginal lateral zone ; Endo, endoderme ; Total embryo (E) was analysed in parallel. (D) RT-PCR analysis on adult tissues. *Ornithine decarboxylase* (*odc*) and *elongation factor 1* (*ef1α*) were used as controls. A reaction was performed in the absence of reverse transcriptase (-RT).

RESULTS

***Xenopus Vgll4* gene is structurally equivalent to mammalian orthologues and produces two transcripts that are differentially regulated during development**

In a previous work, we have reported the identification of the four members of the *Vestigial-like* (*Vgll*) gene family in *Xenopus* and their expression during development (Faucheux et al., 2010). *Vgll4* gene is the only member of the family to be maternally expressed with a constant expression level throughout development (Barrionuevo et al., 2014; Faucheux et al., 2010). We initially characterized a *vgll4* mRNA (*vgll4-L*) that encodes a 293 amino acids protein. A second *Xenopus laevis* *vgll4* mRNA (*vgll4-S*) is present in databases and has 93% identity with the first one. They correspond to the products of two *vgll4* homeologs genes, *vgll4-L* and *vgll4-S*, as expected from the allotetraploid nature of the *Xenopus laevis* genome. The synteny analysis confirmed that *vgll4-L* was the homolog of mammalian *VGLL4* genes while *vgll4-S* corresponded to the duplicated gene (data not shown). According to databases, the mammalian *VGLL4* gene contains two alternative promoters allowing the production of two proteins with distinct N-terminal ends. We asked whether such an isoform was also produced by the amphibian *vgll4* genes. We cloned by a RACE strategy a cDNA whose sequence is totally identical to the cDNA sequence *vgll4-L* but that diverge in its 5' sequence. The corresponding mRNA encodes a protein of 286 amino acids with a unique 22 amino acids N-terminal end (supplementary material Fig. S1). This suggest that two distinct mRNAs are produced by the amphibian gene. To clarify the situation, we retrieved *vgll4* genomic sequences from data bank and their comparison with cDNA sequences allowed us to establish the complete genomic organization of the *Xenopus laevis* *vgll4-L* and *vgll4-S* genes. The two amphibian *vgll4* genes are structurally identical to their mammalian orthologs with 6 exons and two promoters, producing two distinct mRNAs, *vgll4-LA* *vgll4-LB* or *vgll4-SA* and *vgll4-SB* that have unique 5' sequence (Fig. 1A) (Simon et al., 2015).

We next analysed the expression of the *vgll4* genes by semi-quantitative RT-PCR. As previously published, *vgll4-LA* mRNA is maternally expressed and found at a constant

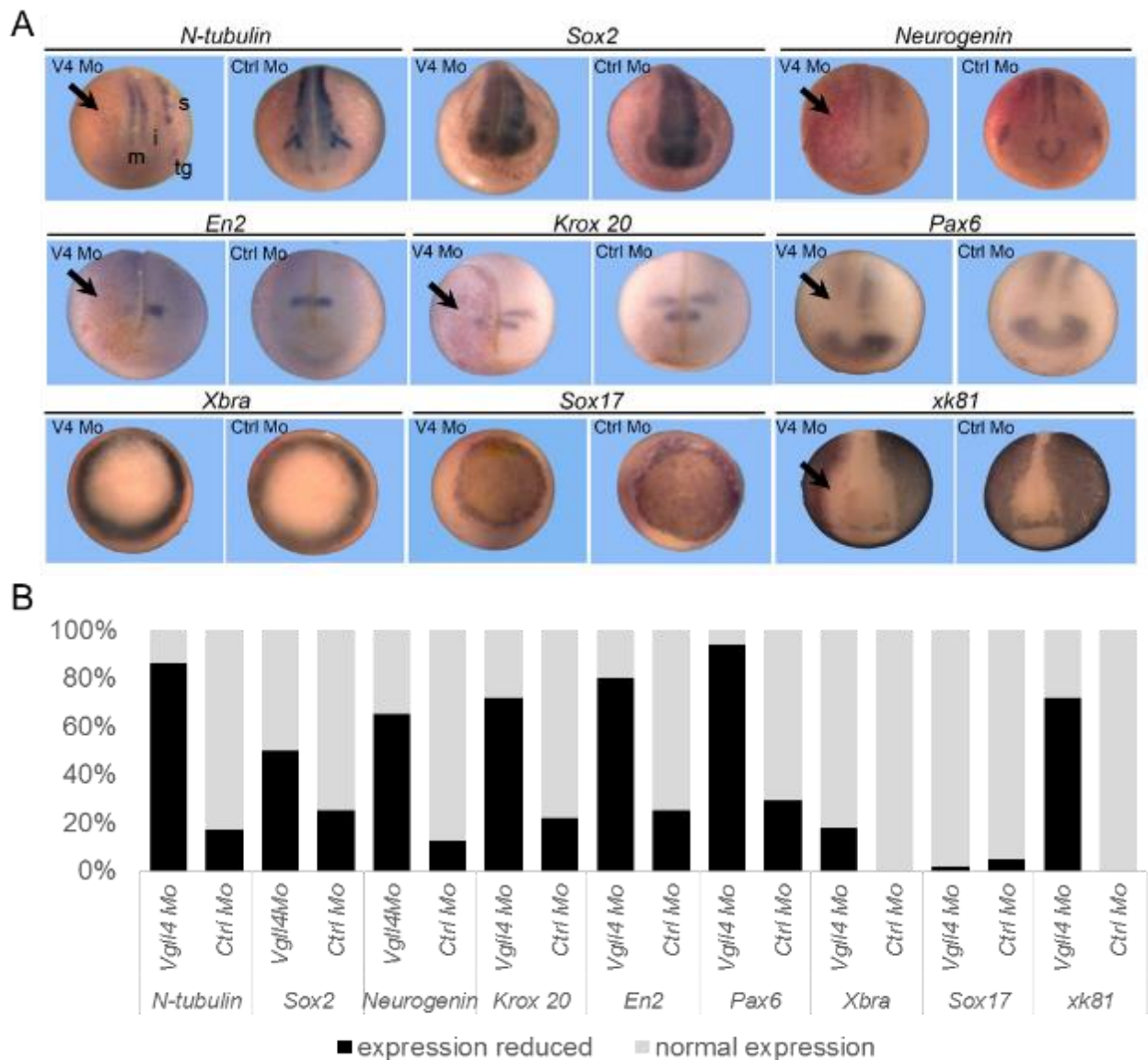


Fig. 2. *Vgll4* depletion blocks neuronal differentiation.

(A) Morpholino against *vgll4* (V4 Mo) and Mo control (Ctrl Mo) were injected into one blastomere of 2-cell stage *Xenopus* embryos and morphants were analysed by *in situ* hybridisation for *N-tubulin*, *sox2*, *neurogenin*, *en2*, *krox20*, *pax6*, *xbra*, *sox17* and epidermal keratin (*xk81*) expression. The injected side is on the left. Moteur (m) inter (i) and sensory (s) primary neurons and the trigeminal placode (tg) are shown. Arrows indicate change in expression induced by V4 Mo. Embryos are viewed on their dorsal side, anterior to bottom. (B) The histogram represents the percentage of embryos displaying decreased or normal gene expression.

level during embryogenesis (Fig.1B) (Barrionuevo et al., 2014; Faucheux et al., 2010). *Vgll4-LB* is also expressed maternally but its level decreases after blastula stage and shows no detectable zygotic expression (Fig. 1A). In gastrula stage embryo, both transcripts are found in all parts of the embryo analysed and in all adult tissues. *Vgll4-LA* is ubiquitously expressed while *vgll4-LB* is predominantly expressed in the ovary (Fig. 1C, D). For convenience and because the two homeolog genes *vgll4-L* and *vgll4-S* have the same expression pattern, we will use for the rest of the paper *vgll4* as gene name (Fig. 1, data not shown).

***Vgll4* is required for early steps of neurogenesis**

In neurula embryo, *vgll4* is expressed in neural plate and neural folds; we therefore investigated the effects of its loss of function on neural development through the use of an antisense morpholino oligonucleotide strategy. In preliminary experiments we found that *vgll4-LB* and *vgll4-SB* mRNAs knockdown had no effect on embryonic development nor neuronal gene expression as expected from genes that are not zygotically expressed (data not shown). Therefore we focused on *vgll4-LA* and *vgll4-SA* mRNA and, because the two *vgll4* genes have the same expression pattern, we will use for simplicity of presentation *vgll4* for the rest of the paper. A morpholino directed against *vgll4* mRNA (*V4Mo*) sequence and a mismatch morpholino were designed and only *V4Mo* reduced *vgll4A* mRNA translation (supplementary material Fig. S2). In a first series of experiments, 10 ng of morpholino directed against *vgll4* were injected into one cell of 2-cell stage embryos and morphants were analysed for *N-tubulin* expression that marks zones of primary neurogenesis. At neurula stage, embryos injected with control Mo showed no modification in *N-tubulin* expression in contrast to *vgll4* depleted embryos where *N-tubulin* expression is dramatically reduced on the injected side, with sensitive neurons and trigeminal placode cells being mainly affected (86%, n=78) (Fig. 2). *Sox2* is an early marker of neural development and expressed in proliferating neuronal progenitors before *N-tubulin* expression (Mizuseki et al., 1998). Upon injection of *vgll4* Mo, 85% of embryos (n=43) showed a reduction of *sox2* expression on the injected side (Fig. 2). To further characterize the phenotype

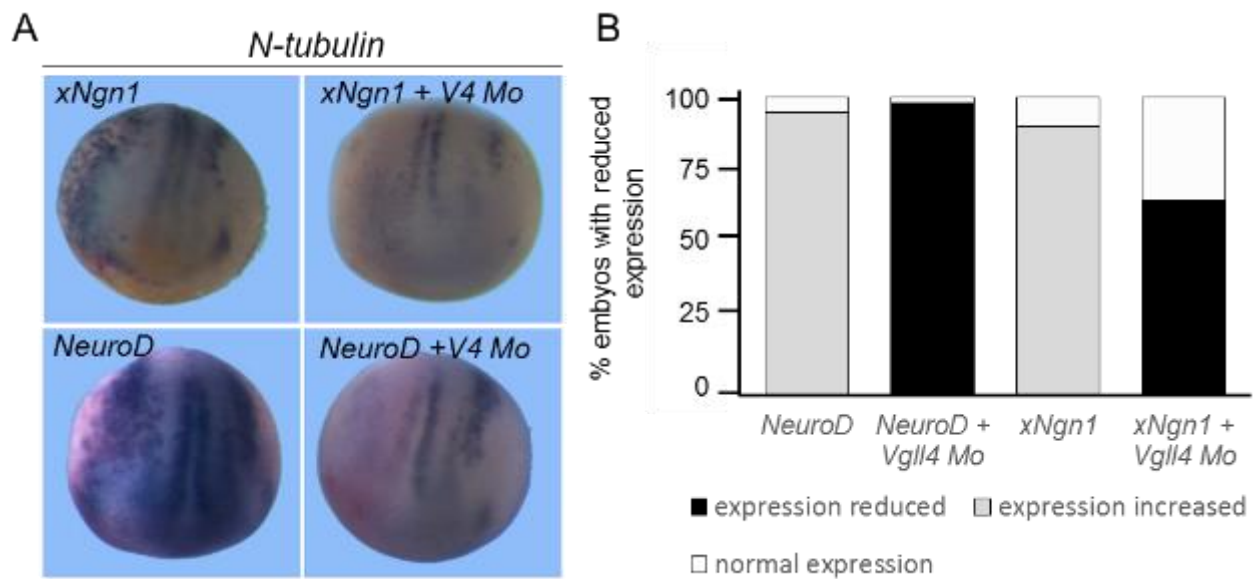


Fig. 3. Vgll4 is required for the proneural activities of *xNgnr1* and *NeuroD*.

(A) *N-tubulin* expression in embryos injected with *xNgn1* or *NeuroD* alone or with V4 Mo. Injected side is on the left. Embryos are viewed on their dorsal side. (B) The histogram represents the percentage of embryos displaying decreased, increased or normal gene expression.

of *vgll4*-depleted embryo, we examined the expression of *neurogenin* (*Ngn1*), a proneural bHLH factor that is essential for the commitment of neural fate and expressed in primary neuron precursors in the embryo (Ma et al., 1996). *Ngn1* expression is strongly reduced in *vgll4* morphant embryos (65%, n=48) indicating that *vgll4* function very early in neural development. We next asked if regional neural markers were affected by *vgll4* knockdown. The expression of *En2* (Midbrain-hindbrain boundary) and *krox 20* (hindbrain) is severely reduced in morphant embryos (61%, n=40 for *en2* and 90%, n=28 for *krox20*) (Fig. 2). Since *Vgll4* is expressed in optic vesicle of stage 24 embryo and later in whole eye, we therefore analysed the expression of the early eye field marker *pax6*. Stage 15 embryos injected with *vgll4* Mo showed a reduction of *pax6* expression, both on its anterior and neural tube domains of expression (94%, n=16). All the markers tested so far indicate that the neurectoderm layer is mainly affected in *vgll4* morphant embryos.

Therefore to determine if this effect was germ layer specific, we analysed in morphant embryos the expression of *xbra* and *sox17* that are specific to mesoderm and endoderm layers respectively. *Vgll4* morphant embryos showed no sign of reduction of *xbra* (82%, n=50) or *sox17* (98%, n=50) expression (Fig. 2).

Finally, we analysed the expression of the epidermal marker keratin (*xk81*) to ask if reduction of cells expressing neural markers could correspond to an extension of the ectodermal territory. Stage 15 *vgll4* morphant embryos showed a reduction in keratin expression on the injected side (72%, n=32) (Fig. 2). In all experiments, neither the injection of a control Mo (Ctrl Mo) nor a mismatch Mo had an effect on the expression of any of the markers tested. Collectively these results support the hypothesis that *vgll4* is required at an early step of neurogenesis.

Vgll4 is required for neurogenesis induced by proneural bHLH transcription factors

Because *vgll4* seems to act early within the proneural pathway, we examined if its loss of function could affect proneural activities of the bHLH proteins neurogenin (*ngn1*) and neuroD. In agreement with previous studies, embryos injected with 100 pg of *ngn1* mRNA alone showed a strong ectopic expression of *N-tubulin* on the injected side (Fig. 3) (Seo et al., 2005).

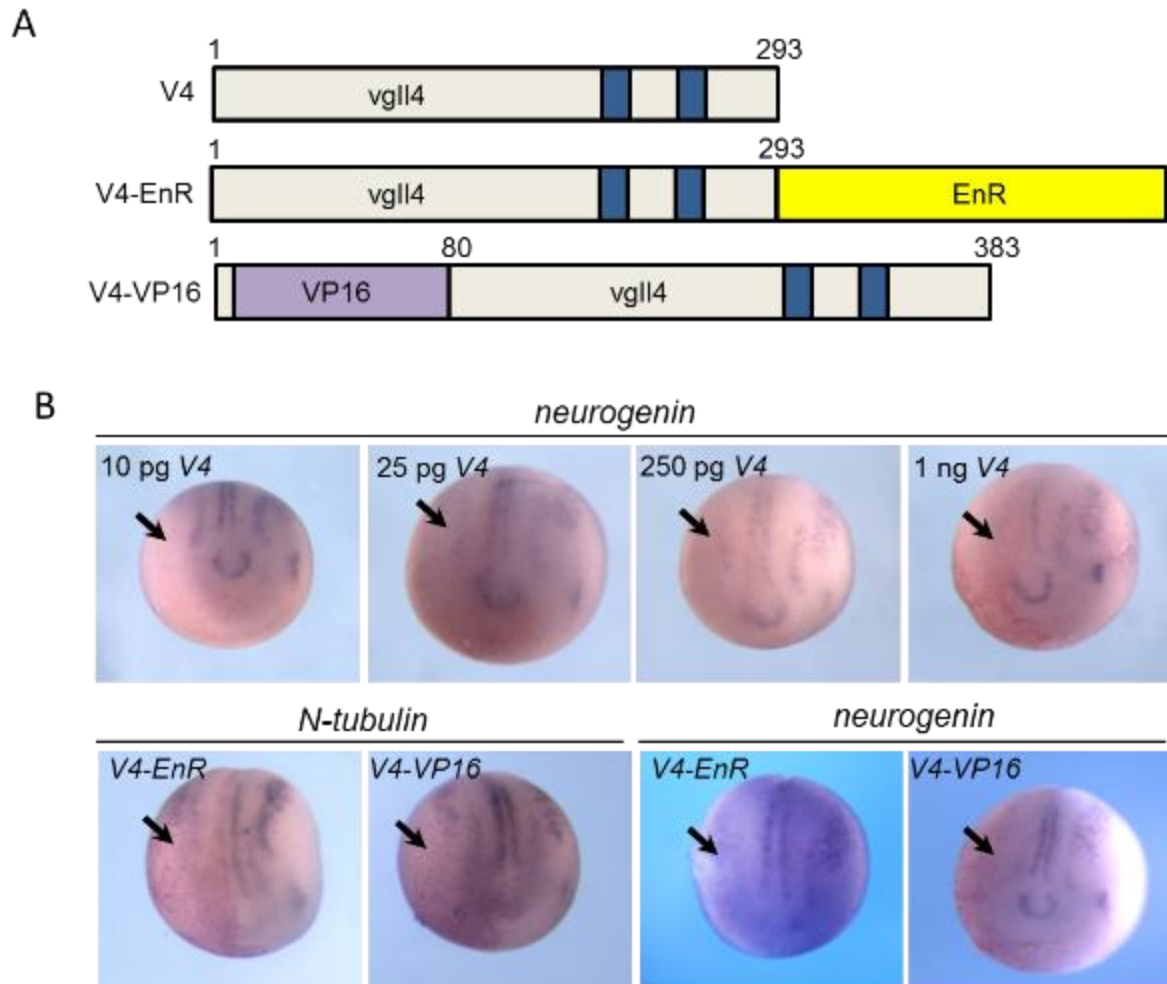


Fig. 4. *Vgl4* overexpression blocks neurogenesis.

(A) Schematic representation of the *vgl4* constructs. (B) Expression of *neurogenin* or *N-tubulin* in embryos injected with different concentration of *vgl4* (V4), V4-EnR or V4-VP16. Arrows indicate change in gene expression. Injected side is on the left. Embryos are viewed on their dorsal side, anterior to bottom.

However, ectopic expression of *N-tubulin* was greatly reduced by co-injection of 10 ng of *vgll4-Mo* (in 90% embryos, n=20). *NeuroD* is acting downstream of *neurogenin* in the neural pathway and can induced ectopic *N-tubulin* expression in *Xenopus* embryo (Lee et al., 1995; Seo et al., 2005). As expected, the injection of 200 pg of *NeuroD* mRNA caused an increase of *N-tubulin*-positive cells but co-injection of 10 ng *vgll4* MO blocked *N-tubulin* induction by *neuroD* (95%, n=21) (Fig. 2). These results suggest that the proneural activities of *neurogenin* and *NeuroD* are *vgll4*-dependent.

***Vgll4* gain-of-function or loss-of-function affect neurogenesis**

Vgll4 is a co-transcription factor that has no DNA binding domain but interacts with TEAD proteins in order to regulate target genes expression. To further understand the role of *vgll4* in early neural development, we undertook overexpression studies. We made constructs that enable the production of mRNA encoding a wild type form of *vgll4* or we fused the coding sequence of *vgll4* with the Engrailed (*EnR*) repression domain or the VP16 activation domain (Fig. 4A). Embryos were injected into one cell at the two-cell stage with increasing doses of *vgll4* mRNA and analysed for *ngn1* expression. As shown in Fig. 4B, *neurogenin* expression is reduced in embryos injected with *vgll4* mRNA at a dose as low as 10 pg (76%, n=38). When increasing amounts of *vgll4* mRNA, 25 pg (65%, n=26), 250 pg (64%, n=42) or 1ng (75%, n=16) are injected, embryos displayed the same phenotype with reduced expression of *ngn1* (Fig. 3A).

Next, we injected either 200pg of *V4-VP16* mRNA or 50 pg of *V4-EnR* mRNA and neural development was assessed by *n-tubulin* or *ngn1* expression. In both cases, overexpressing *V4-VP16* or *V4-EnR* mRNA reduced neuron formation on injected side as indicated by a repression of *n-tubulin* expression (Fig. 4B). The expression of *ngn1* is also reduced in embryos where *V4-VP16* or *V4-EnR* mRNA are overexpressed (Fig. 4B). This indicates that *vgll4* can function as a repressor or an activator to inhibit early neural pathway and neuronal differentiation.

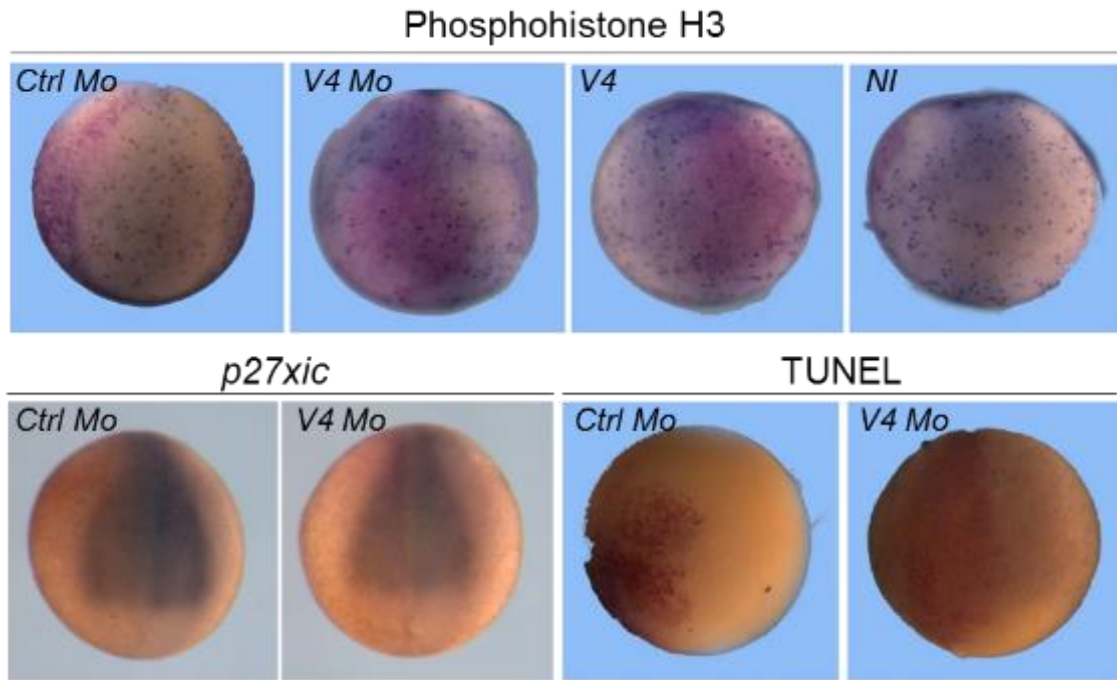


Fig. 5. Proliferation and apoptosis are unchanged in *vgl14* depleted embryo. Embryos injected with *Ctrl Mo* or *V4 Mo* into one blastomere of two cell stage were analysed by immunostaining to detect phosphohistone H3, or by *in situ* hybridisation for *p27^{xic}* expression and TUNEL. Dorsal views excepted for lateral views (*V4*, *NI*). Injected side is on the left. *NI*: uninjected side.

Proliferation and apoptosis are not affected in *vgll4*-depleted embryos

Our data indicate that *vgll4* depleted embryos display defect in neural development and neuronal differentiation. One possible explanation is a decrease in the proliferation of proneural cells or alternatively to an increase in the number of apoptotic cells.

To address whether loss of *ngnr1* and *n-tubulin* signals is caused by reduced cell proliferation, we examined the numbers of cells immunoreactive for phosphohistone H3. Early *neurula* embryos injected with 10 ng of *vgll4*-Mo showed, on their injected side, no differences in phosphohistone H3 labelling compared to uninjected side or when injected with control Mo (Ctrl Mo) (Fig. 5). In addition, the expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{xic1}, that marks cells destined to become primary neurons, is unaffected in morphant embryos (Fig. 5). Embryos injected with 10 ng of *vgll4*-Mo were allowed to develop to mid-neurula stage and then assessed by TdT-mediated dUTP nick end labelling (TUNEL) staining. Again, no differences in TUNEL assay was noted. Taken together these results strongly suggest that the loss of *vgll4* expression reflects altered cell specification rather than death of specific cell population or proliferation/cell cycle progression defects.

***Vgll4* is required to neural cell crest formation and *Vgll4*-depleted embryos develop an abnormal craniofacial skeleton**

Since *vgll4* is expressed in neural crest cells, we decided to analyze whether neural crest cells were affected in *vgll4*-depleted embryos. We first analysed the expression of *snail2* (or *slug*) and *sox9* that are two specific premigratory neural crest cells markers (Betancur et al., 2010). Upon injection of 10 ng of *vgll4* Mo, stage 15 embryos showed a reduction or a complete loss of *snail2* (76%, n=34) and *sox9* expression (79%, n=31) (Fig. 6). Neural crest arises between neural plate and epidermis at the neural border which is specified by a combination of transcription factors such as *pax3* and *zic1* that play a key role in premigratory neural crest induction (Milet et al., 2013). In *vgll4* morphant embryos, *pax3* expression is severely reduced

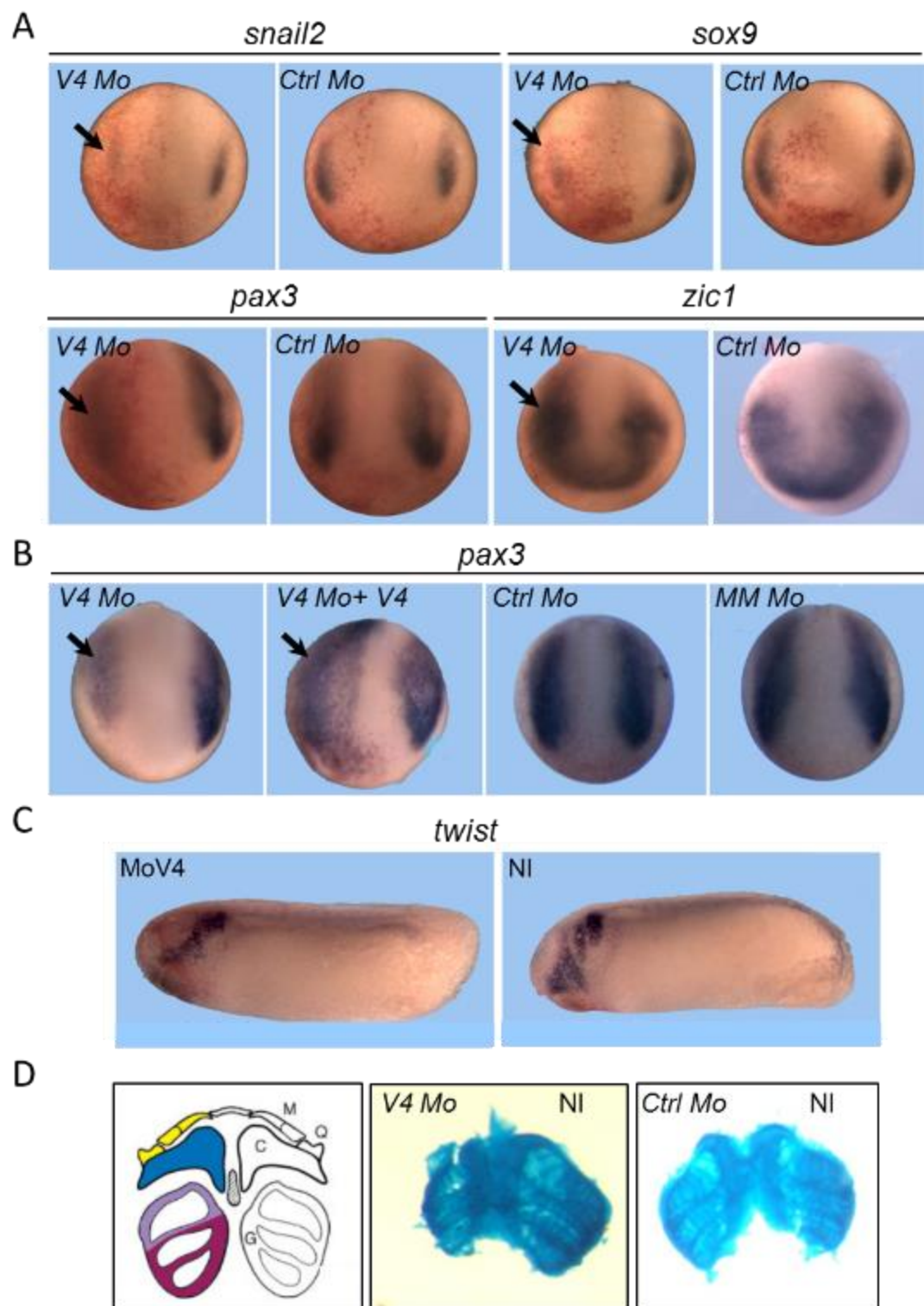


Fig. 6. Vgll4 is required for neural crest formation.

V4 Mo and Ctrl Mo were injected into one blastomere of 2-cell stage embryos and analysed by *in situ* hybridisation. (A) Neural crest markers *snail2*, *sox9*, *pax3* and *zic 1*. (B) *Pax3* expression in embryos injected with V4 Mo alone or with V4 mRNA and a mismatch Mo (MM Mo) and Ctrl Mo. Embryos were analysed by *in situ* hybridisation for *pax 3* expression (C) *Twist* expression. (D) Schematic representation of *Xenopus* head cartilage (from Baltzinger et al., 2005), alcian blue-stained dissection from stage 45 injected tadpole. Arrows indicate change in expression induced by V4 Mo. Dorsal views (A and B) or lateral views (C).

on the injected side (83%, n=60) (Fig. 6A). Control Mo (83%, n=18) or Mo mismatch (78%, n=27) have no effect on *pax3* expression and the morphants *pax3* can be rescued by co-injection of *vgll4* mRNA (77%, n=30) (Fig. 6B). In contrast, the expression of *zic1*, a neural plate border specifier increased in *vgll4*-depleted embryos (Fig. 6A).

This suggests that the cells that did not express neural crest markers were blocked in a neural late border state and/or adopted alternative fates, such as placodes.

Notch signaling, and its downstream target *hairy2*, have been showed to be implicated in the regulation of *snail2* (Glavic et al. 2004). *Hairy2* expression is also extended on the injected side of morphant embryos (50%, n=56). After induction, neural crest cells undergo an epithelial-to-mesenchymal transition and migrate into several locations to give rise to a large variety of derivatives. At the cranial level, neural crest migrates through pharyngeal arches and will later contribute to cranial skeletal derivatives. Because *vgll4* is expressed in migrating neural crest, we further analysed the pharyngeal arch phenotype of *vgll4* depleted embryos. Embryos were injected with 10 ng of *vgll4*-Mo into one dorsal blastomere at eight-cell stage and with β -galactosidase mRNA. A subset of embryos were fixed, stained and analysed for *twist* expression.

The remaining of the embryos were allowed to develop up to stage 42 and processed for β -gal and Alcian Blue staining for skeletal analysis. Stage 25 morphant embryos showed a reduced expression of *twist* on the injected side (Fig. 6C). At later stage, the morphology of *vgll4*-depleted embryos revealed reduction of cranial structures on injected side when compared with control Mo injected embryo (Fig 6D). Meckel's and cerathoyal cartilage are mainly affected. Interestingly, this phenotype is very similar to *sox9* or *twist* morphant embryos (Lander et al., 2013; Spokony et al., 2002). Because we previously showed that loss of *vgll4* expression does not affect apoptosis or cell proliferation, this suggest that *vgll4* is involved at an early stage of neural crest specification and in the development of canial neural crest derivatives.

We next tested the effect of *vgll4* overexpression on neural crest cell development. Embryos were injected with increasing amounts of *vgll4* mRNA and fixed at stage 15, stained for β -galactosidase and analysed for *pax3* expression. Embryos injected with 750 pg of *vgll4* mRNA showed an enlargement of *pax3* expression domain (24%, n=21) (Fig. 7). This enlargement is more obvious when 1 ng of mRNA is injected

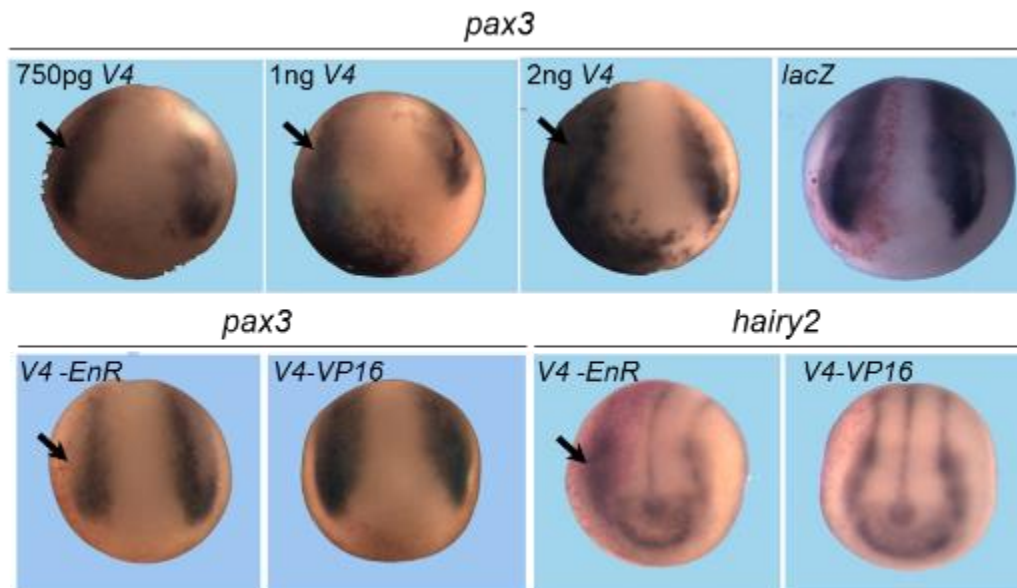


Fig. 7. *Vgll4* overexpression stimulates neural crest development. Embryos injected with different concentrations of *V4*, *V4-EnRB* or *V4-VP16* mRNAs were analysed by *in situ* hybridisation for *pax 3* and *hairy 2* expression. *Lac Z* mRNA was injected as a control. Injected side is on the left. Embryos are viewed on their dorsal side, anterior to bottom.

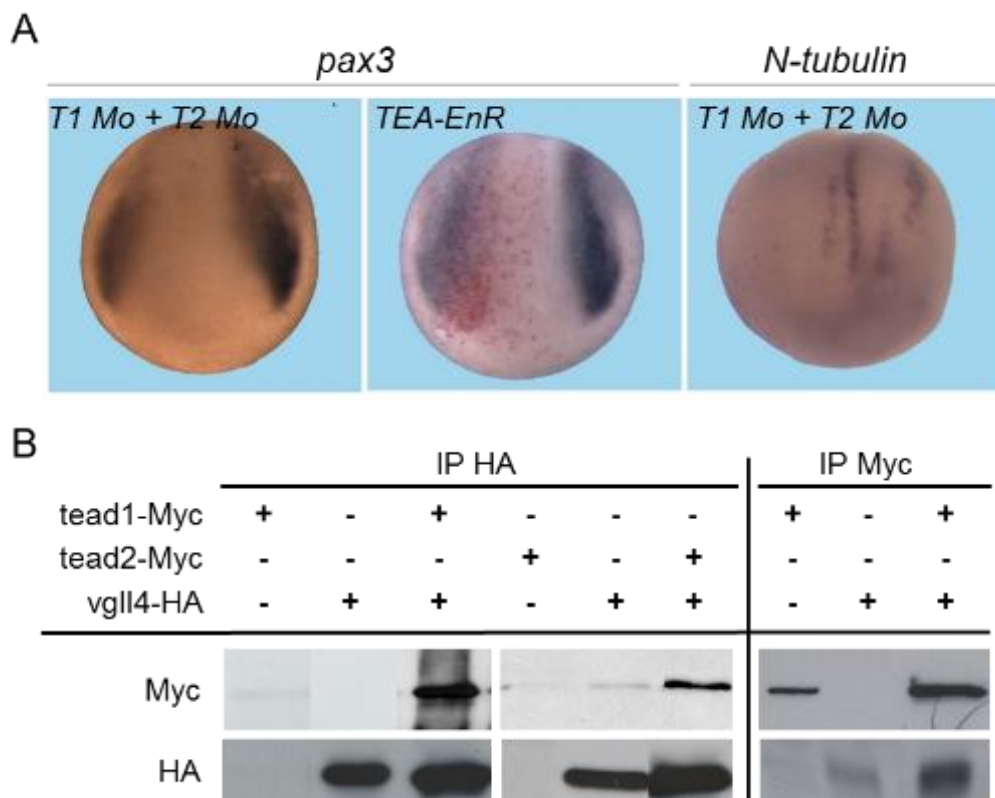


Fig. 8. *Vgll4* physically interacts with Tead1 and Tead2. (A) *In situ* hybridisation analysis of *Pax3* and *N-tubulin* expression of embryos injected into one blastomere of 2-cell stage with Tead1 Mo (T1 Mo), Tead2 Mo (T2 Mo) or *Tea-EnR* mRNA. Injected side is on the left. Embryos are viewed on their dorsal side. (B) Western blot analysis with Myc or HA antibodies of immunoprecipitation lysates (IP) from embryos injected with *tead1-Myc* or *tead2-Myc* alone or in combination with *vgll4-HA* mRNA.

(93%, n=31) and is totally penetrant when 2 ng of mRNA are injected (100%, n=23) (Fig. 7). Control embryos injected with 2 ng of lacZ mRNA showed no effect on *pax3* expression (Fig. 7). To determine if *vgll4* acts as a repressor or an activator, we injected V4-VP16 or V4-EnR mRNA respectively. Embryos injected with 200 pg of V4-VP16 mRNA showed an enlargement of *pax3* expression domain while embryos injected with 100 pg of V4-EnR mRNA showed a reduction of its expression domain (Fig. 7). Because overexpression of V4-VP16 phenocopied *vgll4* in expanding *pax3* expression, while V4-EnR reduced *pax3* expression, we may conclude that *vgll4* functions as an activator in the expression of *pax3*.

In embryos injected, *Hairy2* expression domain is enlarged in V4-EnR embryos but unchanged in V4-VP16 injected embryos (Fig. 7). Since *vgll4* does not bind DNA but acts through binding to a transcription factor (like TEAD), we may hypothesize that its repressing activity on *hairy2* expression is not direct otherwise the overexpression of V4-EnR and V4-VP16 should reduce and enlarge *pax3* expression domain respectively.

Tead morphant embryos phenocopy *vgll4* morphants

Vgll4 proteins are unable to bind to DNA and act as transcriptional activator or repressor through DNA binding factors such as TEAD proteins in vertebrate (Scalloped in *Drosophila*). There are two *tead* genes (*tead1/2*) in *Xenopus* and we previously characterized their expression pattern which is similar to those of *vgll4* (Naye et al., 2007). If *tead* proteins are required for *vgll4* functions, then embryos depleted for *tead1/2* should have the same phenotype that *vgll4* depleted embryos. Therefore, we tested this hypothesis. Embryos were injected with 10ng of *tead1/2* Mo into one blastomere at two cell stage and analysed at early neurula stage for the expression of *pax3* and *n-tubulin*. Embryos showed a reduced expression of *pax3* (60%, n=21) or *n-tubulin* (92%, n=25) on their injected side compared to control uninjected side (Fig. 8A). Interestingly, embryos injected with a repressor form of *tead* proteins (TEA-Enr) phenocopied the injection of *tead1/2* Mo and showed a strong reduction (81%, n=16) of *pax3* expression (Fig. 8A). It has been showed that *tead* overexpression expanded *pax3* expression in *Xenopus* neurula embryo (Gee et al., 2011). Therefore, together with our data, this indicates that *vgll4* and *tead1/2* behave in the same way regarding

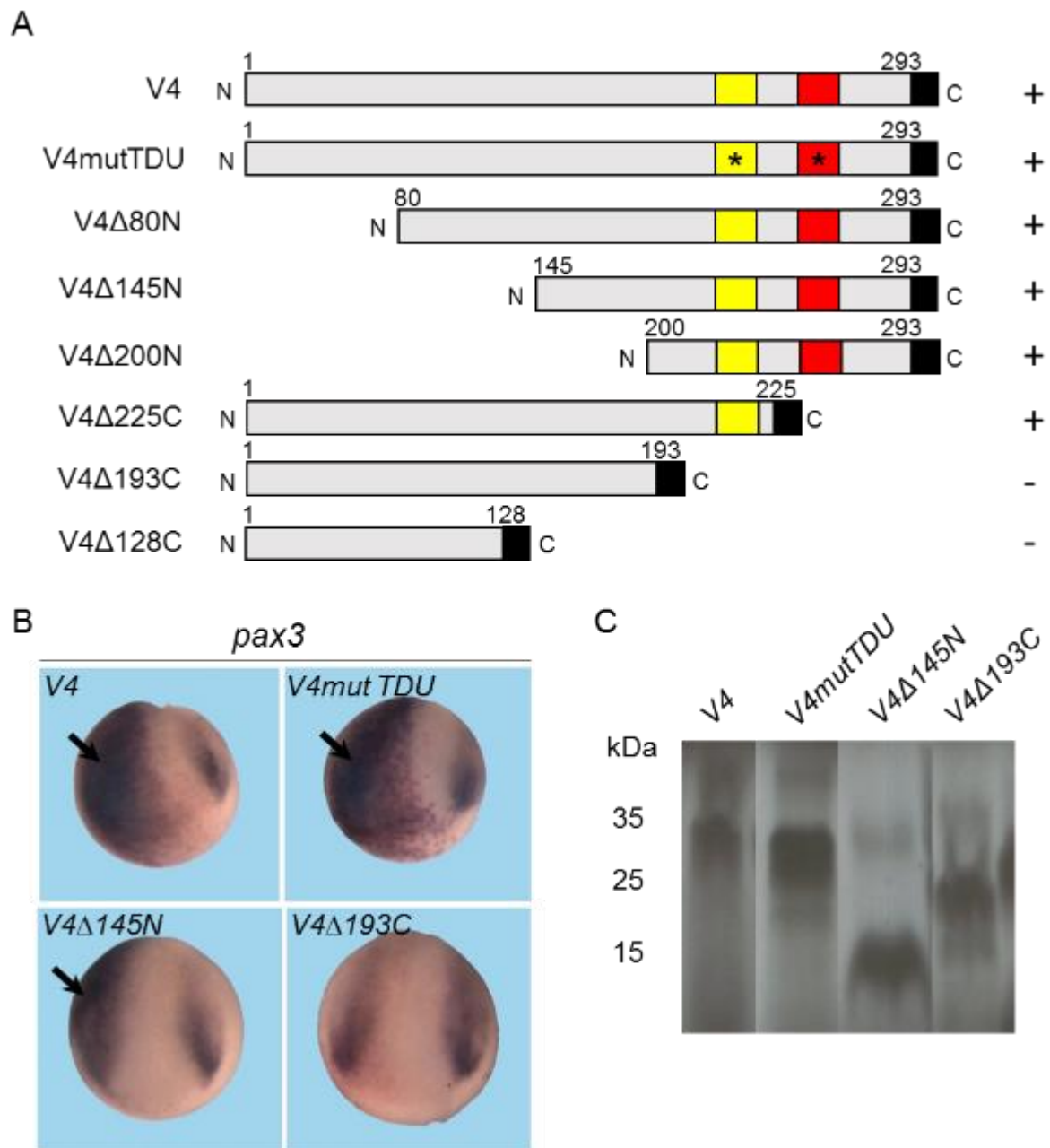


Fig. 9. Vgl4 can bypass tead inteaction to activate *pax3*.

(A) Schematic representation of *vgl4* constructs. HA tag is figured in black box. * in V4mut TDU indicates mutations of the TDU domains. *Pax3* expression in the embryos injected with the constructs is indicated on the right (+/-). (B) *In situ* hybridization analysis of *pax3* expression in embryos injected with the relevant mRNAs. Arrows indicate change in expression. Injected side is on the left. Embryos are viewed on their dorsal side, anterior to bottom. (C) PAGE analysis of *in vitro* translation products in reticulocyte lysates of the different mRNAs injected in B.

pax3 expression and this strongly suggests that they interact in the embryo as expected from our current knowledge. To confirm the interaction between *vgll4* and *tead* proteins, embryos were co-injected in two blastomeres at two-cell stage with *vgll4*-HA or *tead1/2*-Myc mRNAs. At blastula stage, embryos were lysed and immunoprecipitation was performed with HA or MYC antibodies. As shown in Figure 8B, *vgll4* protein can interact with both *tead1* and *tead2* proteins in the embryo. Taken together, these results demonstrate that *vgll4* can function in the embryo through its interaction with *tead* proteins.

Vgll4 can bypass its interaction with *tead* for its activity

Vgll4 proteins interact with *tead* proteins through their Tondu domains that has been widely characterized. The two domains of *vgll4* are necessary for the interaction with *tead* and a complete inhibition of the interaction is observed when both domains are mutated on their conserved sequence VXXHF (Guo et al., 2013; Koontz et al., 2013). We have showed that *vgll4* can interact with *tead* in the embryo and that *vgll4* or *tead* depletion (or V4-EnR or TEA-EnR overexpression) induced a reduction of *pax3* expression domain. Conversely, *vgll4* or *tead* overexpression (or V4-VP16 overexpression) expanded *pax3* expression domain. These data suggest that the protein complex *vgll4*-*tead* can activate *pax3* gene expression in the embryo. We therefore investigated if the interaction between the two proteins is indeed required for *pax3* expression. We mutated both Tondu domains in *vgll4* protein according to published works and made several constructs corresponding to either N-terminal or C-terminal deletions of the protein (Fig. 9A) (Guo et al., 2013; Koontz et al., 2013). mRNAs encoding wild type or mutant *vgll4* proteins were injected into one blastomere of two cell stage embryo and embryos were collected at stage 15 and analysed for *pax3* expression. As expected, injection of wild type *vgll4* encoding mRNA induced strong *pax3* expression on the injected side (Fig. 9B). Surprisingly, the overexpression of *vgll4* mutated on both Tondu domains still expanded *pax3* expression domain (87%, n=32). The overexpression of a protein deleted from its N-terminal end (V4Δ145N) induced expansion of *pax3* expression domain equivalent to the wild type protein (86%, n=35). On the contrary, embryos that overexpress a deleted protein from its C-terminal end and the two Tondu domains showed no effect on *pax3* expression domain (27%, n=29) (Fig. 9B). In vitro translation assay confirmed that all mRNA were translated with

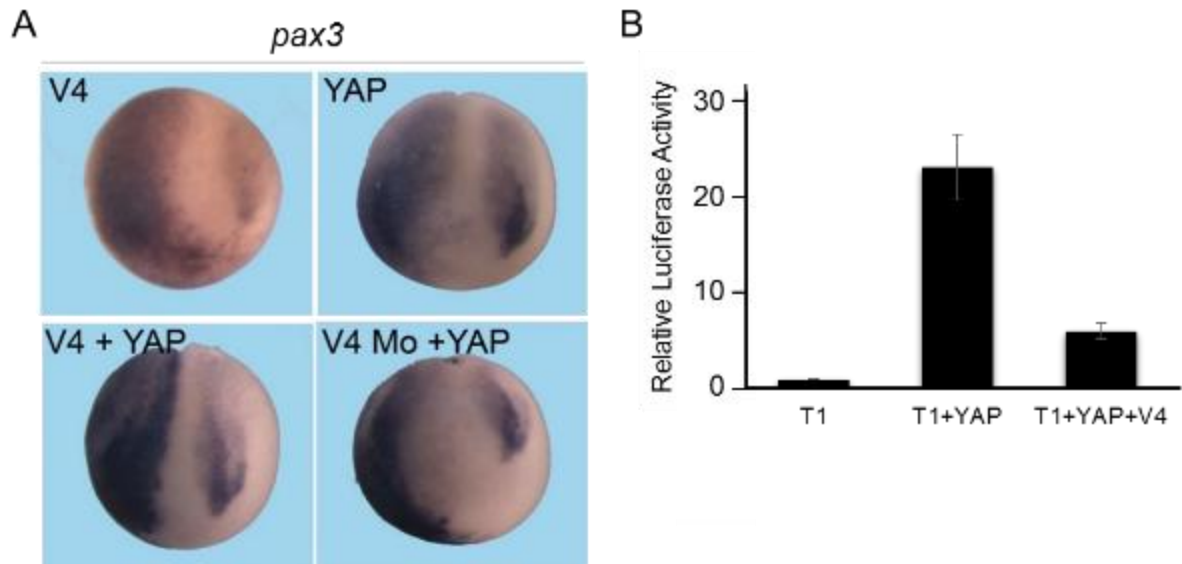


Fig. 10. Vgll4 activity dependent and independent of YAP.

(A) *In situ* hybridisation of *pax3* expression in embryos injected with V4, YAP or V4 and YAP mRNA and with V4 Mo and YAP mRNA. (B) Luciferase activity of pGL284-LUC reporter gene in animal caps explants from embryos injected with T1, T1 + YAP or T1+ YAP+V4 mRNAs. Relative firefly luciferase activity (RLU) was normalized with Renilla luciferase activity

the same efficiency precluding variations in expression levels of the different proteins (Fig. 9C). Those data suggest that the ability of *vgll4* to activate *pax3* is not strictly dependent of its interaction with *tead* but suggests the potential interaction with other transcription factors in a *Tondu* independent way.

Vgll4 has distinct properties with regard to yap-dependent transcription

Tgi, the *Drosophila* homolog of vertebrate VGLL4 has been shown to be able to compete for the binding of Yorkie (YAP homolog) to Scalloped (TEAD homolog) and therefore to inhibit Hippo pathway (Guo et al., 2013; Koontz et al., 2013). This property could confer tumor suppressor activity to VGLL4 as it has been observed in several cancer. We tested if *vgll4* could block *yap* activity in the embryo. *Yap* mRNA was injected alone or in combination with *vgll4* mRNA into one blastomere at two cell stage. Embryos were collected and analysed for *pax3* expression. As already observed, overexpression of *yap* induced an expansion of *pax3* expression domain on the injected side (97%, n=67) (Fig. 10A) (Ghee et al.; 2011). When *yap* and *vgll4* mRNA are co-injected, the expanded *pax3* expression domain is wider and more intense than with *vgll4* or *yap* alone (100%, n=31) (Fig. 10A). Because *vgll4* and *yap* overexpression can both induce *pax3* expression we tested whether *yap* could rescue *vgll4* morphants embryos. *Vgll4* Mo were co-injected with *yap* mRNA into one blastomere at two cell stage and stage 15 embryos were subsequently analysed for *pax3* expression. As shown in Fig.10A, morphants embryos injected with *yap* mRNA showed *pax3* expression on the injected side indicating that *yap* can rescue *vgll4* depletion. The experiments that are used to demonstrate that VGLL4 for YAP/TEAD interaction are performed in cell culture with a reporter gene that has several TEAD binding sites. We have previously showed that the α -tropomyosin gene was regulated in the embryo by a *cis*-regulatory sequence containing a TEAD binding site (or M-CAT) (Pasquet et al., 2006). We used such a sequence to determine if *vgll4* could compete for YAP/TEAD transcriptional activity. The plasmid 4xMCAT that contains four TEAD binding sites driving the luciferase gene was injected in two blastomeres at two cell stage with various mRNA combinations and animal caps are explanted at blastula stage and proceeded for luciferase activity. Embryos co-injected with *tead1* mRNA showed a very low level of luciferase activity while when co-injected with both *tead1* and *yap* mRNA

they showed a strong luciferase activity (Fig. 10B). This activity is significantly reduced when *vgll4* mRNA is co-injected (Fig. 10B).

Together these experiments indicate that *vgll4* can block a yap-dependent transcriptional activation of a reporter gene in embryonic cells but not a yap-dependent *pax3* activation.

DISCUSSION

In the present study, we have addressed the functions of *vgll4* during early development in the *Xenopus* model. We have previously described the amphibian *vgll* genes and found they are highly conserved to their mammalian counterparts (Faucheux et al., 2010; Simon et al.). *Vgll4* carries two Tondu domains and is the homolog to the recently described *Drosophila* Tgi, while *vgll1-3* have a single Tondu domain and are homolog to the *Drosophila* Vestigial, the founding member of the Vestigial family (Guo et al., 2013; Koontz et al., 2013; Simon et al.). We confirm here that the amphibian *vgll4* gene has the same structure than its mammalian ortholog with two promoters and six exons. A close inspection of databank confirm that the avian gene presents also the same structural organization. The only report on VGLL4 in human describes its expression in adult heart, kidney and brain as well as in other tissues at lower levels (Chen et al., 2004b). The amphibian gene is also expressed in most adult tissues and this is related to its distal promoter activity while the internal promoter is only active in ovary. During embryonic development, the *vgll4* gene is expressed at a constant level and only from the internal promoter.

Vgll4 is required for early steps of neurogenesis

Since we and others have found that *vgll4* is expressed in the animal pole at gastrula stage and then in the anterior and posterior regions of the neural plate and neural folds, we have addressed its function in neurogenesis (Barrionuevo et al., 2014; Faucheux et al., 2010). *Vgll4* depleted embryo clearly showed an impaired neurogenesis defect as assessed by *N-tubulin* expression decrease. In those experiments, early markers of differentiation such as *pax6*, *en2* or *krox20* are also down regulated like the proneural *sox2* gene, albeit to a lower extent. One striking observation is that the expression of the neuronal determination factor *neurogenin* is also down regulated in *vgll4* morphant embryos and that *vgll4* is required for the

proneural activities of both *neurogenin* and *neuroD*. In those experiments, neither apoptosis nor proliferation are adversely affected confirming that *vgll4* is controlling the differentiation step in the process of neurogenesis. From knock-down experiments, we may hypothesize that *vgll4* could be an activator of the *neurogenin* gene in the early embryo. Interestingly, the *Xenopus* promoter gene contains five M-CAT binding sites that are known to be bound by TEAD proteins (data not shown). It would be relevant to test them in transgenic assay to evaluate whether they are important for *neurogenin* expression. Finally, although *vgll4* has a wide expression domain in blastula embryo its function is clearly germ layer specific and restricted to neuroectoderm as neither mesoderm nor endoderm development are impaired in our knock-down experiments.

Our experiments clearly show that *vgll4* overexpression induces *neurogenin* down regulation and also *N-tubulin*, likewise expected. This suggests that gain or loss of function of *vgll4* gives the same phenotype and blocks neurogenesis. We have confirmed these results by using overexpression of either *vgll4*-VP16 or *vgll4*-EnR proteins. One possible explanation to those results is to consider a functional dependence on protein-protein interaction where proper stoichiometry of each partner is essential. This is quite conceivable as *vgll4* like other vestigial-like family members are cofactors and whose function relies on transcriptional partners like TEAD (Chen et al., 2004b; Halder and Carroll, 2001; Simon et al.; Vaudin et al., 1999). Alternatively, one possibility is that *vgll4* stimulates key negative regulators of neurogenesis like *hairy1*, a member of the HES family of transcription factors that is a downstream effector of Notch pathway (Davis and Turner, 2001) (Ishibashi et al., 1995). Interestingly, the promoter of the *Xenopus hairy 1* (HES1) gene, as well its mammalian orthologs, has been shown to contain a highly conserved M-CAT sequence that is necessary for its enhancer functions (Jeziorska et al., 2012). In addition, we have evidence that *vgll4* can stimulate *hairy1* expression in animal cap explants (data not shown). Together our data suggest that *vgll4* expression level might be critical for normal neurogenesis and any fluctuation can have irreversible effect on the process.

Vgll4 is required to neural cell crest formation and Vgll4-depleted embryos develop an abnormal craniofacial skeleton

Because *Vgll4* is expressed in neural crest cells, we have addressed its potential function in the initial phase of their formation. Neural crest development relies on a complex gene regulatory network that is highly conserved between vertebrates

(Betancur et al., 2010; Prasad et al., 2012). *Snail2* and *sox9* are two of the earliest neural crest specifier genes and are expressed in premigratory neural crest cells (Spokony et al., 2002). *Vgll4* depleted embryo showed clearly a down regulation of both genes at the premigratory stage indicating that *vgll4* acts upstream of both factors. Surprisingly when *vgll4* is depleted there is also down regulation of *pax3* expression suggesting that *vgll4* regulates earlier stage of neural crest formation and the signals that emanate from the neural plate border (Monsoro-Burq et al., 2005). Surprisingly, *zic1*, another neural border specifier like *pax3* is upregulated in *vgll4* morphant embryos. This might be an indirect consequence of the *pax3* downregulation observed in *vgll4* depleted embryo. Indeed it has been observed that *zic1* expression domain was expanded in *pax3* depleted embryo (Hong and Saint-Jeannet, 2007). Since *vgll4* depletion induces *pax3*, *snail2* and *sox9* down regulation it is not surprising that *vgll4* morphant embryos show a reduction in *twist* expressing cells at the migratory stage and consequently head cartilage defects. This is reminiscent of phenotype observed in the case of *twist* depletion or *sox9* (Lander et al., 2013; Spokony et al., 2002).

Overexpression of *vgll4* strikingly stimulates *pax3* ectopic expression in a dose dependent manner in the early embryo. Similarly to the native protein, the VP16-*vgll4* fusion protein gives the same phenotype indicating that *vgll4* function as a transcriptional activator of *pax3*. As expected, the EnR-*vgll4* protein has the opposite effect and down regulates *pax3* expression. The implication of *Vgll4* in neural crest cells development is also supported by the observation that *Hairy2* expression is stimulated in *vgll4* depleted embryo. *Hairy2* has been found to have an important role in the specification of neural crest cells (Nichane et al., 2008b). In this work, overexpression of *pax3* or *zic1* causes an expansion of *hairy2* expression domain. This is in agreement with our findings where *vgll4* stimulates *pax3* expression while *vgll4* depletion increases *zic1*, the output being the stimulation of *hairy2* expression.

Vgll4 forms a complex with tead in the embryo but this interaction can be bypass

Vestigial-like proteins do not bind to DNA but instead form a complex with TEAD proteins to ensure their functions. We have observed that embryos depleted for *tead1* and *tead2*, the two proteins expressed in the embryo, have the same phenotype than embryos depleted for *vgll4* with a reduction in *pax3* and *N-tubulin* expression. Moreover, a fusion protein EnR-tead, like EnR-*vgll4* induces a reduction of *pax3* expression. Furthermore, *tead1* overexpression stimulates, albeit faintly, ectopic *pax3*

expression (Gee et al., 2011). Together, this suggests that *vgll4* and *tead* are acting in the same pathway and accordingly, we have confirmed that the two proteins could interact in the embryo. However, we have found that this interaction was not entirely responsible for the effects observed in *vgll4* depleted embryo. Mutation of the two Tondu domains in the *drosophila* *vgll4* ortholog *tgi* abrogates its interaction with *Scalloped* (the TEAD ortholog) (Guo et al., 2013; Koontz et al., 2013). Similarly, in-frame deletion of both domains prevents interaction between human *vgll4* and TEAD (Chen et al., 2004b). In our experiments, a *vgll4* protein where the two Tondu domains have been mutated still retains its ability to induce ectopic *pax3* expression. In contrast, a protein where the N-terminal part of the protein including the two Tondu domains have been deleted lost its *pax3*-inducing ability. We may conclude that *vgll4* can bypass its binding to *tead* to activate *pax3* in the embryo, suggesting interaction with other yet uncharacterized transcription factor. The transcription factor MEF2 has been found to interact with human *vgll4* through one Tondu domain while TEAD could interact preferentially with the other domain (Chen et al., 2004b). We have no evidence whether *vgll4* can interact with *mef2* in the *Xenopus* embryo but this would deserve investigation since *mef2* has been found to be involved in neural crest development in mouse and zebrafish (Miller et al., 2007). Another major partner protein of TEAD is the oncogene YAP which is the effector of the hippo pathway, the complex TEAD/YAP activating genes that stimulates proliferation and inhibit apoptosis (Chan et al., 2011a; Harvey et al., 2013). Yap overexpression in the embryo stimulates ectopic *pax3* activation in the *Xenopus* embryo (Gee et al., 2011). The recently discovered *Drosophila* *tgi* has been shown to be able to compete YAP for the formation of the complex TEAD/YAP thus inactivating its transcriptional activity. Similarly we have found that *vgll4* can reduce the transcriptional activity of the TEAD/YAP complex in the embryo. However, unexpectedly, *vgll4* cannot suppress yap-induced *pax3* ectopic expression and on the contrary increases it. On the other hand, we found that YAP overexpression can rescue *vgll4* depleted embryo and restore *pax3* expression.

In conclusion, our work describes for the first time the functions of *vgll4* during early development. Our findings that *vgll4* regulates during neural development and neural crest formation will undoubtedly have important issues on its functions during mammalian development and pathologies associated to *vgll4* expression misregulation.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the University of Bordeaux and the CNRS.

REFERENCES

- Barrionuevo, M.G., Aybar, M.J., Tribulo, C., 2014. Two different vestigial like 4 genes are differentially expressed during *Xenopus laevis* development. *The International journal of developmental biology* 58, 369-377.
- Bernard, F., Lalouette, A., Gullaud, M., Jeantet, A.Y., Cossard, R., Zider, A., Ferveur, J.F., Silber, J., 2003. Control of apterous by vestigial drives indirect flight muscle development in *Drosophila*. *Developmental biology* 260, 391-403.
- Betancur, P., Bronner-Fraser, M., Sauka-Spengler, T., 2010. Assembling neural crest regulatory circuits into a gene regulatory network. *Annual review of cell and developmental biology* 26, 581-603.
- Bonnet, A., Dai, F., Brand-Saberi, B., Duprez, D., 2009. Vestigial-like 2 acts downstream of MyoD activation and is associated with skeletal muscle differentiation in chick myogenesis. *Mech Dev* 127, 120-136.
- Chan, S.W., Lim, C.J., Chen, L., Chong, Y.F., Huang, C., Song, H., Hong, W., 2011. The Hippo pathway in biological control and cancer development. *J Cell Physiol* 226, 928-939.
- Chen, H.H., Mullett, S.J., Stewart, A.F., 2004. Vgl-4, a novel member of the vestigial-like family of transcription cofactors, regulates alpha1-adrenergic activation of gene expression in cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* 279, 30800-30806.
- Davis, R.L., Turner, D.L., 2001. Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning. *Oncogene* 20, 8342-8357.
- Deng, H., Bell, J.B., Simmonds, A.J., 2010. Vestigial is required during late-stage muscle differentiation in *Drosophila melanogaster* embryos. *Molecular biology of the cell* 21, 3304-3316.
- Faucheux, C., Naye, F., Treguer, K., Fedou, S., Thiebaud, P., Theze, N., 2010. Vestigial like gene family expression in *Xenopus*: common and divergent features with other vertebrates. *The International journal of developmental biology* 54, 1375-1382.
- Gee, S.T., Milgram, S.L., Kramer, K.L., Conlon, F.L., Moody, S.A., 2011. Yes-associated protein 65 (YAP) expands neural progenitors and regulates Pax3 expression in the neural plate border zone. *PloS one* 6, e20309.
- Gunther, S., Mielcarek, M., Kruger, M., Braun, T., 2004. VITO-1 is an essential cofactor of TEF1-dependent muscle-specific gene regulation. *Nucleic acids research* 32, 791-802.
- Guo, T., Lu, Y., Li, P., Yin, M.X., Lv, D., Zhang, W., Wang, H., Zhou, Z., Ji, H., Zhao, Y., Zhang, L., 2013. A novel partner of Scalloped regulates Hippo signaling via antagonizing Scalloped-Yorkie activity. *Cell research* 23, 1201-1214.
- Guss, K.A., Nelson, C.E., Hudson, A., Kraus, M.E., Carroll, S.B., 2001. Control of a genetic regulatory network by a selector gene. *Science* 292, 1164-1167.
- Halder, G., Carroll, S.B., 2001. Binding of the Vestigial co-factor switches the DNA-target selectivity of the Scalloped selector protein. *Development (Cambridge, England)* 128, 3295-3305.
- Halder, G., Polaczyk, P., Kraus, M.E., Hudson, A., Kim, J., Laughon, A., Carroll, S., 1998. The Vestigial and Scalloped proteins act together to directly regulate wing-specific gene expression in *Drosophila*. *Genes & development* 12, 3900-3909.
- Harland, R.M., 1991. In situ hybridization: an improved whole-mount method for *Xenopus* embryos. *Methods Cell Biol* 36, 685-695.

- Harvey, K.F., Zhang, X., Thomas, D.M., 2013. The Hippo pathway and human cancer. *Nature reviews. Cancer* 13, 246-257.
- Hensey, C., Gautier, J., 1997. A developmental timer that regulates apoptosis at the onset of gastrulation. *Mechanisms of development* 69, 183-195.
- Hong, C.S., Saint-Jeannet, J.P., 2007. The activity of Pax3 and Zic1 regulates three distinct cell fates at the neural plate border. *Molecular biology of the cell* 18, 2192-2202.
- Ishibashi, M., Ang, S.L., Shiota, K., Nakanishi, S., Kageyama, R., Guillemot, F., 1995. Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects. *Genes Dev* 9, 3136-3148.
- Jeziorska, D.M., Koentges, G., Vance, K.W., 2012. Novel cis-regulatory modules control expression of the Hairy and Enhancer of Split-1 (HES1) transcription factor in myoblasts. *J Biol Chem* 287, 5687-5697.
- Jiao, S., Wang, H., Shi, Z., Dong, A., Zhang, W., Song, X., He, F., Wang, Y., Zhang, Z., Wang, W., Wang, X., Guo, T., Li, P., Zhao, Y., Ji, H., Zhang, L., Zhou, Z., 2014. A peptide mimicking VGLL4 function acts as a YAP antagonist therapy against gastric cancer. *Cancer Cell* 25, 166-180.
- Johnson, C.W., Hernandez-Lagunas, L., Feng, W., Melvin, V.S., Williams, T., Artinger, K.B., 2011. Vgll2a is required for neural crest cell survival during zebrafish craniofacial development. *Developmental biology* 357, 269-281.
- Kim, J., Sebring, A., Esch, J.J., Kraus, M.E., Vorwerk, K., Magee, J., Carroll, S.B., 1996. Integration of positional signals and regulation of wing formation and identity by *Drosophila* vestigial gene. *Nature* 382, 133-138.
- Koontz, L.M., Liu-Chittenden, Y., Yin, F., Zheng, Y., Yu, J., Huang, B., Chen, Q., Wu, S., Pan, D., 2013. The Hippo effector Yorkie controls normal tissue growth by antagonizing scalloped-mediated default repression. *Developmental cell* 25, 388-401.
- Lander, R., Nasr, T., Ochoa, S.D., Nordin, K., Prasad, M.S., Labonne, C., 2013. Interactions between Twist and other core epithelial-mesenchymal transition factors are controlled by GSK3-mediated phosphorylation. *Nat Commun* 4, 1542.
- Lee, J.E., Hollenberg, S.M., Snider, L., Turner, D.L., Lipnick, N., Weintraub, H., 1995. Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science (New York, N.Y.)* 268, 836-844.
- Li, H., Wang, Z., Zhang, W., Qian, K., Liao, G., Xu, W., Zhang, S., 2015. VGLL4 inhibits EMT in part through suppressing Wnt/beta-catenin signaling pathway in gastric cancer. *Medical oncology (Northwood, London, England)* 32, 83.
- Ma, Q., Kintner, C., Anderson, D.J., 1996. Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell* 87, 43-52.
- Maeda, T., Chapman, D.L., Stewart, A.F., 2002. Mammalian vestigial-like 2, a cofactor of TEF-1 and MEF2 transcription factors that promotes skeletal muscle differentiation. *The Journal of biological chemistry* 277, 48889-48898.
- Mann, R.S., Carroll, S.B., 2002. Molecular mechanisms of selector gene function and evolution. *Current opinion in genetics & development* 12, 592-600.
- Mielcarek, M., Gunther, S., Kruger, M., Braun, T., 2002. VITO-1, a novel vestigial related protein is predominantly expressed in the skeletal muscle lineage. *Mech Dev* 119 Suppl 1, S269-274.
- Mielcarek, M., Piotrowska, I., Schneider, A., Gunther, S., Braun, T., 2009. VITO-2, a new SID domain protein, is expressed in the myogenic lineage during early mouse embryonic development. *Gene expression patterns : GEP* 9, 129-137.
- Milet, C., Maczkowiak, F., Roche, D.D., Monsoro-Burq, A.H., 2013. Pax3 and Zic1 drive induction and differentiation of multipotent, migratory, and functional neural crest in *Xenopus* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 5528-5533.
- Miller, C.T., Swartz, M.E., Khuu, P.A., Walker, M.B., Eberhart, J.K., Kimmel, C.B., 2007. *mef2ca* is required in cranial neural crest to effect Endothelin1 signaling in zebrafish. *Dev Biol* 308, 144-157.

- Monsoro-Burq, A.H., Wang, E., Harland, R., 2005. Msx1 and Pax3 cooperate to mediate FGF8 and WNT signals during *Xenopus* neural crest induction. *Developmental cell* 8, 167-178.
- Naye, F., Treguer, K., Soulet, F., Faucheux, C., Fedou, S., Theze, N., Thiebaud, P., 2007. Differential expression of two TEF-1 (TEAD) genes during *Xenopus laevis* development and in response to inducing factors. *The International journal of developmental biology* 51, 745-752.
- Nichane, M., Ren, X., Souopgui, J., Bellefroid, E.J., 2008. Hairy2 functions through both DNA-binding and non DNA-binding mechanisms at the neural plate border in *Xenopus*. *Developmental biology* 322, 368-380.
- Nieuwkoop, P.D., Faber, J., 1975. Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin), in: Co, E.N.-H.P. (Ed.), 2nd ed. Garland, Amsterdam.
- Pasquet, S., Naye, F., Faucheux, C., Bronchain, O., Chesneau, A., Thiebaud, P., Theze, N., 2006. Transcription enhancer factor-1-dependent expression of the alpha-tropomyosin gene in the three muscle cell types. *The Journal of biological chemistry* 281, 34406-34420.
- Paumard-Rigal, S., Zider, A., Vaudin, P., Silber, J., 1998. Specific interactions between vestigial and scalloped are required to promote wing tissue proliferation in *Drosophila melanogaster*. *Development genes and evolution* 208, 440-446.
- Prasad, M.S., Sauka-Spengler, T., LaBonne, C., 2012. Induction of the neural crest state: control of stem cell attributes by gene regulatory, post-transcriptional and epigenetic interactions. *Dev Biol* 366, 10-21.
- Seo, S., Richardson, G.A., Kroll, K.L., 2005. The SWI/SNF chromatin remodeling protein Brg1 is required for vertebrate neurogenesis and mediates transactivation of Ngn and NeuroD. *Development* 132, 105-115.
- Simmonds, A.J., Liu, X., Soanes, K.H., Krause, H.M., Irvine, K.D., Bell, J.B., 1998. Molecular interactions between Vestigial and Scalloped promote wing formation in *Drosophila*. *Genes Dev* 12, 3815-3820.
- Simon, E., Faucheux, C., Zider, A., Thézé, N., Thiébaud, P., From Vestigial to Vestigial-like: the *Drosophila* that has taken wing. Submitted.
- Spokony, R.F., Aoki, Y., Saint-Germain, N., Magner-Fink, E., Saint-Jeannet, J.P., 2002. The transcription factor Sox9 is required for cranial neural crest development in *Xenopus*. *Development (Cambridge, England)* 129, 421-432.
- Sudarsan, V., Anant, S., Guptan, P., VijayRaghavan, K., Skaer, H., 2001. Myoblast diversification and ectodermal signaling in *Drosophila*. *Developmental cell* 1, 829-839.
- Treguer, K., Faucheux, C., Veschambre, P., Fedou, S., Theze, N., Thiebaud, P., 2013. Comparative functional analysis of ZFP36 genes during *Xenopus* development. *PLoS One* 8, e54550.
- Vaudin, P., Delanoue, R., Davidson, I., Silber, J., Zider, A., 1999. TONDU (TDU), a novel human protein related to the product of vestigial (vg) gene of *Drosophila melanogaster* interacts with vertebrate TEF factors and substitutes for Vg function in wing formation. *Development (Cambridge, England)* 126, 4807-4816.
- Zhang, W., Gao, Y., Li, P., Shi, Z., Guo, T., Li, F., Han, X., Feng, Y., Zheng, C., Wang, Z., Chen, H., Zhou, Z., Zhang, L., Ji, H., 2014. VGLL4 functions as a new tumor suppressor in lung cancer by negatively regulating the YAP-TEAD transcriptional complex. *Cell Res* 24, 331-343.

```

Vg114-LA      MLALTMDDLNYQYLHNMMNNNIAILCYEGEAAALRSDPRVQPLPMSSALSNNHRTAPPPISP
Vg114-LB      -MENPLDVLRS-----AASLVHADDEKREAAALRSDPRVQPLPMSSALSNNHRTAPPPISP
               :  :*:*.      . :      : *****

Vg114-LA      SKRRFSMDQGDELECDNDHVSMSRMFAPHITKSLNGDYRKEHRDRSRSPIERAAAPT
Vg114-LB      SKRRFSMDQGDELECDNDHVSMSRMFPFHITKSLNGDYRKEHRDRSRSPIERAAAPT
               *****

Vg114-LA      SLHASHLYGIPPLAVDQPLALTKNSMDASRSMGIVPPMERQQNRPSVITCAPASNRNCSL
Vg114-LB      SLHASHLYGIPPLAVDQPLALTKNSMDASRSMGIVPPMERQQNRPSVITCAPASNRNCSL
               *****

Vg114-LA      SHCPTVTHSGCASAAPGNFRFPSNTTTACDPVVEEHFRRSLGKKNYKEPEPVANSVSITGS
Vg114-LB      SHCPTVTHSGCASAVPGNFRFPSNTTTACDPVVEEHFRRSLGKKNYKEPEPVANSVSITGS
               *****
               TDU1
Vg114-LA      SHCPTVTHSGCASAAPGNFRFPSNTTTACDPVVEEHFRRSLGKKNYKEPEPVANSVSITGS
Vg114-LB      SHCPTVTHSGCASAVPGNFRFPSNTTTACDPVVEEHFRRSLGKKNYKEPEPVANSVSITGS
               *****
               TDU2
Vg114-LA      VDDHFAKALGDTWLQIKAADGGPSSPESASRRGQSPPSAHMMNHNHSPSVLS 293
Vg114-LB      VDDHFAKALGDTWLQIKAADGGPSSPESASRRGQSPPSAHMMNHNHSPSVLS 286
               *****

```

Fig. S1. Protein sequence alignment between *Xenopus laevis* vg114-LA et vg114-LB.
Alternate exons are boxed in blue. Tondu (TDU) domains are boxed in yellow

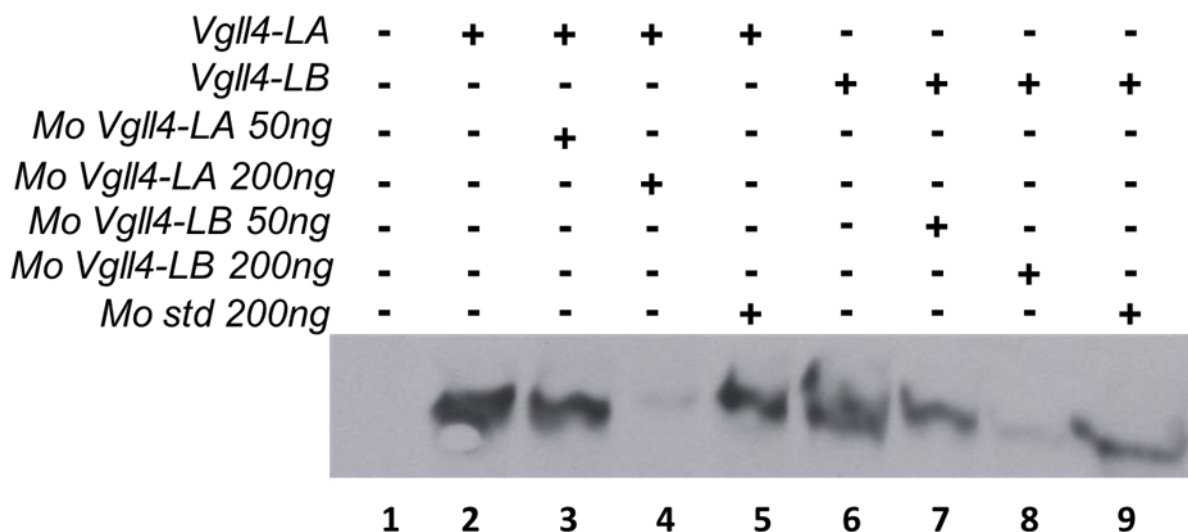


Fig. S2. Inhibition of *vg114-LA* and *vg114-LB* translation by morpholinos.

Vg114-LA and *vg114-LB* were translated *in vitro* in the presence of [³⁵S] methionine and 50 ng or 200 ng of morpholinos directed against *Vg114-LA* and *vg114-LB* or 200 ng of a standard control (Std). Translation products were analysed by SDS-PAGE followed by autoradiography. Lane 1 contains a blank translation (no mRNA).

Discussion

Vestigial-like 4 est un membre de la famille des protéines vestigial qui ont pour caractéristique commune de posséder un domaine très conservé, appelé Tondu, permettant d'interagir avec les facteurs de transcription de la famille TEAD. Le complexe vestigial/TEAD active un ensemble de gènes cibles qui, chez la drosophile, contrôlent la formation de l'aile. Chez les vertébrés, il existe quatre gènes *Vestigial-like* dont la fonction est encore mal connue. L'équipe a caractérisé les quatre gènes *vestigial-like* de xénope et montré que le gène *vgll4* est exprimé maternellement et dans différents tissus embryonnaires tels que le cerveau, le tube neural, la crête neurale, les somites et l'épiderme (Fauchaux et al., 2010). Nos travaux mettent en évidence une double fonction de *vgll4* dans l'embryon : il intervient à une étape précoce de la neurogenèse et il est nécessaire à la formation de la crête neurale. Nos travaux indiquent que *vgll4* interagit avec les deux protéines TEAD1 et TEAD2 que l'équipe a caractérisées chez xénope (Naye et al., 2007). Cependant cette interaction Vgll4/TEAD n'est pas la seule pour expliquer son activité transcriptionnelle.

Le gène *vgll4* de xénope produit deux transcrits exprimés différemment au cours du développement.

Nous avons caractérisé deux gènes homéologues, *vgll4-L* et *vgll4-S* comme attendu d'après le caractère pseudo tétraploïde du génome *Xenopus laevis*. La synténie a confirmé que *vgll4-L* est l'homologue du gène *VGLL4* mammifère et *vgll4-S* correspond au gène dupliqué. Comme le gène *VGLL4* de mammifère, *vgll4-L* possède deux promoteurs alternatifs qui va donner deux isoformes *vgll4-LA* et *vgll4-LB*. Ces deux isoformes sont exprimées maternellement mais seule *vgll4-LB* a une expression zygotique. Chez l'adulte, *vgll4-LA* est exprimé dans tous les tissus alors que *vgll4-LB* est exprimé uniquement dans l'ovaire. Les deux gènes homéologues présentent le même profil d'expression spatio-temporelle.

Le gène *Vgll4* est exprimé dans différents tissus de l'embryon de xénope comme le tube neural, le cerveau, les arcs branchiaux, l'œil, la placode otique, les

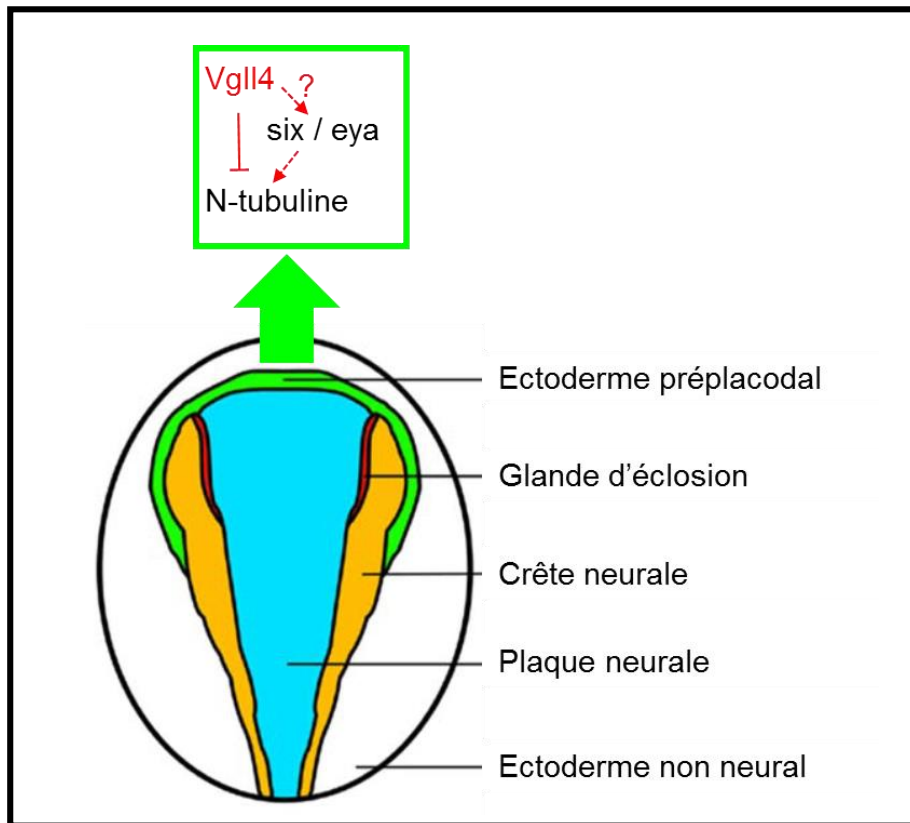


Figure 56 : Vgll4 est impliqué dans la formation de la placode trigéminal. Représentation schématique d'un embryon au stade neurula précoce en vue dorsale (Hong and Saint-Jeannet, 2007). Dans les embryons morphants et dans les embryons surexprimant *vgll4*, l'expression du marqueur n-tubuline est diminuée au niveau de la placode. Cela suggère un rôle de *vgll4* dans la formation de la placode trigéminal qui pourrait passer par les gènes *six* et *eya* impliqués dans la spécification de cette placode.

somites et l'épiderme. Chez l'homme, *VGLL4* est exprimé dans le cerveau, le rein, la rate, les poumons et plus fortement dans le cœur (Chen et al., 2004b). Il n'y a pas de données actuellement sur l'expression du gène *Vgll4* chez la souris ni le poulet.

Chez le poisson-zèbre, il existe également deux homéologues *vgll4* exprimés à la frontière de la plaque neurale à des stades précoces puis dans les arcs branchiaux à des stades plus tardifs (Melvin et al., 2013).

Un gène paralogue *vestigial-like 4 like (vgll4l)* a été décrit récemment chez le xénope (Barrionuevo et al., 2014). Il correspond à un événement de duplication survenu au cours de l'évolution spécifiquement chez les amphibiens et les poissons car il est absent des génomes mammifères et aviaires. Ce gène *vgll4l* est exprimé de manière maternelle et zygotique comme le gène *vgll4*. Chez l'adulte, il est exprimé dans la majorité des organes.

Vgll4 est nécessaire aux étapes précoces de la neurogenèse

Comme *vgll4* est exprimé au stade neurula précoce (st 15-16) dans la plaque neurale et les bourrelets neuraux, nous avons entrepris une étude fonctionnelle ciblée sur le développement neural. Les expériences perte de fonction de *vgll4* montrent une forte diminution des différents marqueurs de la neurogenèse *n-tubuline*, *en2*, *krox20* et *pax6*. *N-tubuline* est un marqueur de la différenciation neuronale exprimé dans les neurones moteurs, les neurones intermédiaires, les neurones sensoriels ainsi que la placode trigéminal. Son expression est plus fortement diminuée dans les neurones sensoriels et la placode trigéminal (Figure 56). Cette dernière correspond au territoire du futur nerf trijumeau, le principal nerf de la sensibilité de la face. La placode trigéminal fait partie des différentes placodes crânielles. Pour confirmer le rôle de *vgll4* au niveau de la placode trigéminal, il serait intéressant d'analyser l'expression des marqueurs spécifiques *six1* et *eya4* connus pour leur rôle dans la formation des placodes crânielles (Zou et al., 2004). En effet, la perte de *eya1* montre une diminution du marqueur neuronal NeuroD dans la placode (Schlosser, 2006). La placode trigéminal correspond au futur territoire du nerf trijumeau, il serait intéressant d'analyser, par immunohistochimie, la formation du nerf trijumeau dans des embryons de stade plus tardif. Les embryons morphants *vgll4* présentent une diminution de l'expression de *pax6* qui est un marqueur de la placode de l'œil impliqué dans la

formation de l'œil (Kondoh et al., 2004). Pour confirmer un rôle de *vgll4* dans la formation de l'œil, il faudrait analyser d'autres marqueurs de l'œil comme les gènes *Pitx* (Pituitary homeobox) exprimés dans la placode de l'œil (Schlosser, 2006) (Figure 56).

L'expression de *neurogénine* est fortement diminuée dans les embryons morphants *vgll4*. *Neurogénine* est un facteur de transcription proneural bHLH essentiel pour la détermination des cellules neurales (Fode et al., 1998; Ma et al., 1996; Scardigli et al., 2001). Nos travaux suggèrent donc une fonction très précoce de *vgll4* dans la mise en place du système nerveux.

Nous avons montré que *Vgll4* est nécessaire à la neurogenèse induite par neurogénine (*ngnr1*) et *neuroD*. Les embryons injectés par *ngnr1* et *neuroD* présentent une augmentation de l'expression de *N-tubuline*. Cette expression ectopique est complètement abolie par l'ajout du morpholino *vgll4*. Ces résultats montrent que *vgll4* est nécessaire à la neurogenèse induite par *neurogénine* et *neuroD* et que *vgll4* pourrait agir au niveau ou en aval de *neurogénine*. Une boucle de régulation pourrait exister entre *vgll4* et *neurogénine*. Pour vérifier cette hypothèse, les ARNm *neurogénine* et *neuroD* pourraient être surexprimés afin d'analyser l'expression de *vgll4*. Si l'expression de *vgll4* est augmentée, on peut émettre l'hypothèse qu'il s'agit d'une boucle de régulation entre les différents gènes. En revanche, si l'expression de *vgll4* n'est pas modifiée, on peut en conclure que *vgll4* agit au même niveau que neurogénine.

Plusieurs voies de signalisation sont impliquées en amont de neurogénine dans la formation du système nerveux, c'est le cas des voies BMP, FGF et Wnt (Aubin et al., 2004; Baker et al., 1999; De Robertis and Kuroda, 2004; Delaune et al., 2005; Fuentealba et al., 2007; Linker and Stern, 2004; Pera et al., 2003; Streit et al., 2000). L'implication de *vgll4* dans l'une de ces voies de signalisation pourrait être envisagée. En effet, nous avons identifié dans la séquence protéique *vgll4* plusieurs des sites phosphorylation potentiels pour la kinase GSK3 impliquée dans la régulation de la neurogenèse.

Vgll4 n'est pas impliqué dans les étapes précoces de la formation du mésoderme ni de l'endoderme car nous n'avons pas observé de diminution de l'expression de *xbra*, marqueur du mésoderme ni de *sox17*, marqueur de l'endoderme.

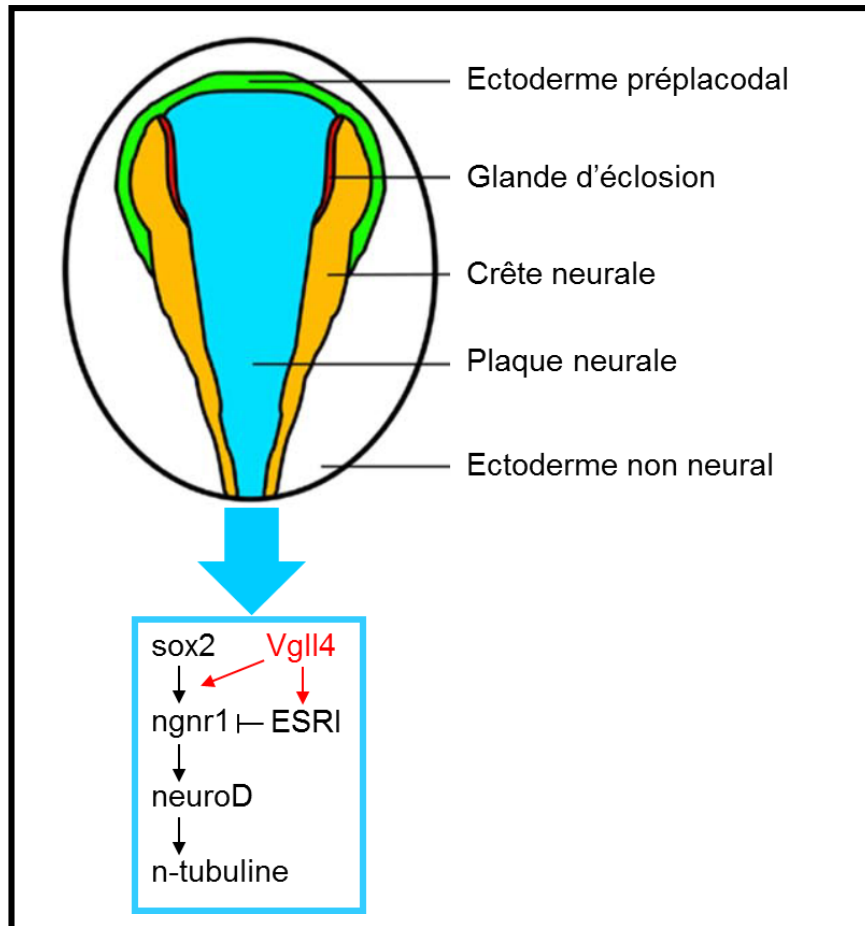


Figure 57 : Vgll4 est impliqué dans la neurogenèse précoce.

Représentation schématique d'un embryon au stade *neurula* précoce en vue dorsale (Hong and Saint-Jeannet, 2007). Dans les embryons morphants et dans les embryons surexprimant *vgll4*, l'expression de *ngnr1* et *n-tubuline* est diminuée au niveau des neurones sensitifs. Des expériences en explants de calotte animale montrent une augmentation de l'expression de *ESR1*, cible de la voie Notch, qui inhibe *ngnr1*. Cela suggère un rôle de *vgll4* dans la neurogenèse précoce qui pourrait passer par la voie Notch.

En revanche, l'expression du marqueur épidermique *xk81* est diminuée dans les embryons morphants. Tous ces résultats confortent une fonction de *vgll4* dans la formation du neur ectoderme à l'origine du système nerveux et de l'épiderme.

La surexpression de *vgll4* inhibe la neurogenèse

Vgll4 est un cofacteur sans domaine de fixation à l'ADN se liant au facteur de transcription Tead. Pour mieux comprendre le rôle de *vgll4* lors des étapes précoces de la neurogenèse, nous avons réalisé des expériences de gain de fonction en surexprimant l'ARNm *vgll4* dans les embryons de xénope. Nous avons observé une diminution de l'expression de *neurogénine* et de *n-tubuline* (Figure 57). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus lors des expériences de perte de fonction de *vgll4*. Nous avons également injecté des formes constitutivement activatrice V4-VP16 ou répressive V4-EnR. Les embryons présentent aussi une diminution des marqueurs de la neurogenèse. Les résultats de perte de fonction et de gain de fonction donnent les mêmes résultats et dans les deux cas *vgll4* inhibe la différenciation neurale. Une explication possible est que la fonction de *vgll4* dépend d'une interaction avec un partenaire et la stœchiométrie de chacun des partenaires est un facteur limitant. Ceci est concevable dans la mesure où *vgll4*, comme toutes les protéines de la famille, interagissent avec les protéines TEAD (Chen et al., 2004a; Chen et al., 2004b; Halder et al., 1998; Vaudin et al., 1999). Une autre hypothèse est que *vgll4* pourrait stimuler un facteur régulateur négatif de la neurogenèse, comme les protéines de la famille HES, qui sont les effecteurs de la voie NOTCH (Davis and Turner, 2001; Ishibashi et al., 1995). De manière intéressante, il a été montré que le promoteur du gène *hairy1* (HES1) possède une séquence M-CAT, présente dans les gènes mammifères et xénope, qui fixe TEAD et est nécessaire à son activité enhancer (Jeziorska et al., 2012). Nos résultats préliminaires montrent que la surexpression de *vgll4*, en explant embryonnaire de calotte animale, stimule l'expression de *esr-1*, un membre de la famille HES et cible de la voie Notch. Quand la voie Notch est active, il y a transcription du gène *esr-1* qui agit comme inhibiteur de *neurogénine* et de la différenciation neurale. Dans nos expériences, on peut supposer que la surexpression de *vgll4* entraîne l'activation de *esr-1* et l'inhibition de *neurogénine* (Figure 57).

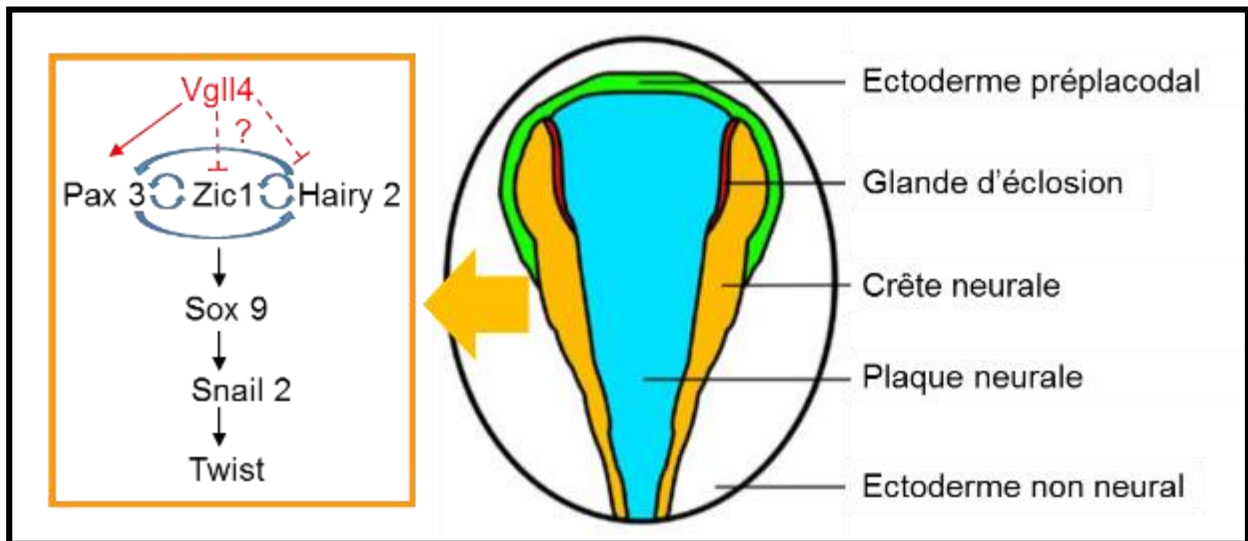


Figure 58 : Vgll4 est impliqué dans la formation de la crête neurale.

Représentation schématique d'un embryon au stade neurula précoce en vue dorsale (Hong and Saint-Jeannet, 2007). Dans les embryons morphants l'expression des marqueurs spécifiques de la CN (*sox9*, *snail2* et *twist*) est diminuée au niveau de la crête neurale. Les marqueurs de la bordure de la plaque neurale responsable de l'induction de la crête neurale sont aussi modifiés : *vgll4* active l'expression de *pax3* dans les embryons. Les embryons morphants présentent une augmentation de l'expression de *zic1* et *hairy 2*. Cet effet peut être direct ou indirect, dû à la perte de l'expression de *pax 3*.

La perte de fonction *vgll4* n'entraîne pas de modification de la prolifération ni de l'apoptose

Nous avons montré que la perte de fonction de *vgll4* dans les embryons entraîne un défaut de différenciation neuronale. Cette diminution peut être due à une diminution de la prolifération des précurseurs neuraux ou une augmentation de l'apoptose des cellules. Dans nos expériences, nous n'avons pas observé de modification de l'expression de phosphohistone H3, marqueur des cellules en prolifération ni de p27^{xic}, inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines et marqueur des cellules destinées à devenir des neurones primaires. Les embryons morphants *vgll4* ne présentent pas d'apoptose dans le test de TUNEL. Ces résultats démontrent que la diminution des marqueurs neuraux observée dans les expériences de perte de fonction n'est pas due à des modifications de la prolifération cellulaire des précurseurs neuraux ou à une augmentation de l'apoptose. *Vgll4* a un rôle déterminant dans la détermination des cellules neurales.

La perte de fonction *vgll4* entraîne un défaut de développement de la crête neurale et de ses dérivés

Au stade neurula précoce (stade 15), *vgll4* est exprimé dans la plaque neurale et les bourrelets neuraux. Au stade neurula âgée (stade 19), *vgll4* est exprimé plus particulièrement au niveau antérieur de la plaque neurale dans les cellules de la crête neurale en migration. La crête neurale est une population de cellules à fort potentiel migratoire induite à la frontière entre la plaque neurale et l'épiderme. Elle est spécifique des vertébrés et à l'origine de nombreux dérivés. Les embryons morphants *vgll4* présentent une diminution de l'expression des gènes spécifiques de la crête neurale *snail2* et *Sox9* (Figure 58). *Snail2* (ou *slug*) et son paralogue *snail* sont des facteurs de transcription à doigt de zinc impliqués dans le déclenchement de la formation de la crête neurale et la transition épithélium-mésenchyme et dans la progression tumorale (Nieto, 2009). *Snail2* est impliqué dans la formation de la crête neurale chez le xénope et le poulet (del Barrio and Nieto, 2002; LaBonne and Bronner-Fraser, 2000; Nieto, 2009). *Sox 9* fait partie de la famille des facteurs de transcription Sox qui sont impliqués dans la spécification des destins cellulaires lors de l'embryogenèse (Kamachi et al.,

2000). Chez la souris, *Sox9* régule la formation du cartilage (Bell et al., 1997; Bi et al., 1999). Chez le xénope, *sox9* est exprimé maternellement et s'accumule après la gastrulation dans la région où se forme la crête neurale (Spokony et al., 2002). Il a été montré que *sox 9* était impliqué dans la spécification de la crête neurale (Spokony et al., 2002). Les embryons morphants *sox9* présentent un phénotype similaire aux morphants *vgll4* à savoir une diminution des marqueurs des cellules de la crête neurale *pax3*, *twist* et *snail2* et un défaut de formation du cartilage de la tête (Spokony et al., 2002). Dans les embryons morphants *sox9*, l'expression de *sox2* est augmentée. Il a été émis l'hypothèse que l'activité de *sox 9* serait requise à la frontière de la plaque neurale et conférerait aux cellules la compétence à répondre aux signaux BMP. *Sox9* pourrait également être requis dans les bourrelets neuraux pour réguler la réponse à la voie de signalisation Wnt, comme pour d'autres membres de la famille Sox lors de la formation des axes (Zorn et al., 1999).

Nous avons montré que *vgll4* était impliqué dans la spécification de la crête neurale, on peut postuler que *vgll4* agit en amont de *sox9* via les mêmes voies de signalisation. Il a été montré qu'un gradient de BMP est nécessaire à l'induction neurale (LaBonne and Bronner-Fraser, 1998b; Nguyen et al., 1998). Les voies de signalisation FGF et Wnt sont également impliquées dans la formation de la crête neurale (Deardorff et al., 2001; Garcia-Castro et al., 2002; Mayor et al., 1997). Comme pour la neurogenèse, il serait important de déterminer si *vgll4* est régulée par ces différents signaux lors de la spécification des cellules de la crête neurale. La voie de signalisation Notch est également impliquée dans la formation de la crête neurale et son inactivation ou sa stimulation entraînent de fortes perturbations de la formation du squelette crânien chez la souris (Cornell and Eisen, 2005). Lors de la gastrulation de l'embryon de xénope, la voie Notch stimule la formation de la crête neurale alors que son inhibition la bloque (Glavic et al., 2004). Nous avons émis l'hypothèse que *vgll4* pouvait être impliqué dans voie Notch lors de la neurogenèse. *Vgll4* étant exprimé lors de la gastrulation, on peut supposer une relation entre la voie Notch et *vgll4* lors de la formation de la crête neurale qu'il serait intéressant de tester.

Les gènes *pax3* et *zic1* sont des gènes spécifiques de la bordure de la crête neurale. Ils possèdent des profils d'expression légèrement différents : *pax3* est exprimé à la frontière de la plaque neurale et dans le futur territoire de la crête neurale

ainsi que dans le territoire de la glande d'éclosion. *Zic 1* est exprimé à la frontière de la plaque neurale, dans le territoire des crêtes neurales ainsi que dans l'ectoderme préplacodal (Hong and Saint-Jeannet, 2007). Il a été montré que les gènes *pax3* et *zic1* agissent en synergie pour l'induction des cellules de la crête neurale (Milet and Monsoro-Burq, 2014; Plouhinec et al., 2014; Sato et al., 2005). Nous avons montré que l'expression de ces deux gènes était affectée dans les embryons morphants *vgll4*. L'expression de *pax3* est fortement diminuée alors que celle de *zic1* est augmentée. L'augmentation de l'expression de *zic1* a été confirmée dans des expériences de dissections d'explants des calottes animales (non montrés). Hong et Saint Jeannet ont montré que les embryons morphants *pax3* présentent également une augmentation de l'expression de *zic1* et une diminution de l'expression de *snail2* (Hong and Saint-Jeannet, 2007). Nos résultats montrent également une augmentation de l'expression de *Hairy 2*. *Hairy 2* est un facteur de transcription qui permet le maintien des progéniteurs neuraux à un état de précurseurs non différenciés (Nichane et al., 2008b). Nos résultats suggèrent que *vgll4* pourrait empêcher la différenciation des cellules de la crête neurale en les maintenant dans un état de progéniteur. Ceci expliquerait aussi la diminution de l'expression des marqueurs spécifiques des cellules de la crête neurale tels que *sox9* et *snail2*. *Vgll4* semble agir au cours de l'étape de spécification de la crête neurale. La diminution de *pax3* dans embryons morphants *vgll4* est spécifiquement liée à l'absence de *vgll4*. En effet, la surexpression de *vgll4* dans ces embryons permet le sauvetage de l'expression de *pax3*.

Après les étapes d'induction et de spécification neurale, la crête neurale va migrer pour former ses différents dérivés. La migration de la crête neurale dépend de la transition épithélium-mésenchyme qui va aboutir à un changement dans l'expression des cadhérines (Cheung and Briscoe, 2003; Cheung et al., 2005; Dottori et al., 2001; McKeown et al., 2005; Nakagawa and Takeichi, 1995) et les cellules vont perdre leurs propriétés d'adhésion cellulaire. La migration des cellules dépend de différents facteurs tels que les éphrines et leurs récepteurs (Adams et al., 2001; Baker and Antin, 2003; Davy et al., 2004; Helbling et al., 1998; Mellott and Burke, 2008; Smith et al., 1997). *Twist* est connu comme étant nécessaire à la migration des cellules de la crête neurale (Soo et al., 2002). Nos résultats montrent une diminution de l'expression de *twist* dans les morphants *vgll4*. Il serait intéressant de déterminer si *vgll4* est impliqué dans la migration de la crête neurale en analysant l'expression des éphrines

et des cadhérines. Nous avons montré que *vgll3* était un facteur important de la régulation de la migration des cellules de crêtes neurales. Nous pourrions réaliser le même type d'expérience de migration *in vitro* sur fibronectine pour *vgll4*.

Les crêtes neurales sont à l'origine de nombreux dérivés comme le cartilage et les muscles de la tête et les cellules pigmentaires. Nous avons montré que les embryons morphants *vgll4* présentent une malformation du cartilage de la tête en particulier du cartilage de Meckel et correspondant à une hypoplasie observée plus précocement dans le territoire de la crête neurale. Cependant, nous n'avons pas analysé l'effet de la perte de fonction *vgll4* sur la formation des muscles et des cellules pigmentaires.

De nombreuses pathologies, regroupées sous le terme de neurocristopathies, ont pour origine des défauts de formation de la crête neurale. Par exemple, le syndrome de Waardenburg est dû à une mutation du gène *PAX3* (Madiha et Khaled, 2015) et conduit à une surdité et à des anomalies de pigmentation. *Vgll4* régule la formation des cellules de la crête neurale et pourrait être un bon marqueur des maladies de la crête neurale.

La surexpression de *vgll4* entraîne une forte augmentation de l'expression de *pax3* dans des territoires dans lesquels il n'est normalement pas exprimé. Ceci est complémentaire des résultats de perte de fonction et confirmé en utilisant des formes de *vgll4* V4-EnR et V4-VP16, respectivement répresseur et activateur. L'ensemble de travaux montrent que la fonction endogène de *vgll4* est activatrice du gène *pax3*. Nous avons identifié dans le promoteur du gène *pax3* de xénope des séquences des *cis*-séquences régulatrices M-CAT potentiellement capables de lier les complexes *vgll4*/tead. Il serait intéressant de tester la fonctionnalité de ces sites en utilisant une stratégie gène rapporteur combinée à des expériences de gel retard et d'immunoprécipitation de la chromatine.

Vgll4 interagit avec Tead mais cette interaction n'est pas la seule pour expliquer l'activation de *pax3*

Les protéines vestigial-like, comme leur homologue drosophile, sont des cofacteurs transcriptionnels qui agissent *via* leur liaison aux protéines TEAD. Si la fonction de *vgll4* passe par son interaction avec *tead* alors les embryons morphants

tead auront le même phénotype que les embryons morphants *vgll4*. Chez le xénope, deux facteurs de transcription Tead ont été caractérisés (Naye et al., 2007). Les embryons morphants *tead1* et *tead2* présentent une diminution de l'expression de *pax3* et *n-tubuline* comme les morphants *vgll4*. La surexpression d'une forme répresseur de tead (TEA-EnR) induit également une diminution de l'expression de *pax3*. Ces résultats phénocopient les résultats obtenus par perte de fonction de *vgll4*. Par ailleurs, il a été montré que TEAD peut activer l'expression de *pax3* dans la crête neurale (Gee et al., 2011). Ces résultats suggèrent fortement que le rôle de *vgll4* est lié à son interaction avec Tead. *Vgll1*, *Vgll2* et *Vgll4* sont connus pour interagir physiquement avec les protéines Tead (Chen et al., 2004b; Gunther et al., 2004; Vaudin et al., 1999). Nous avons aussi montré que *vgll3* interagissait avec *tead1* et *tead2* dans l'embryon de xénope. De la même façon, nous avons démontré *vgll4* pouvait interagir avec Tead1 et Tead 2 *in vivo*.

Pour déterminer les domaines importants et fonctionnels de *vgll4*, nous avons réalisé plusieurs constructions codant des protéines présentant des mutations ou des délétions de la protéine. Les deux domaines tondu de *vgll4* ont été mutés, comme décrit dans la littérature, pour donner des protéines incapables d'interagir avec Tead (Guo et al., 2013; Koontz et al., 2013). Nous avons également réalisé des délétions des régions N-terminale et C-terminale. L'ensemble de ces protéines a été testé pour leur capacité à activer le gène *pax3* dans l'embryon. La mutation des deux domaines Tondu n'a pas d'effet sur la capacité de *vgll4* à activer *pax3*. Ceci indique que l'interaction avec Tead n'est pas essentielle à la fonction activatrice de *vgll4*. La protéine 145-293 conserve sa propriété activatrice de *pax3* au contraire de la protéine 193-293. Ces résultats montrent l'existence d'un domaine important autre que les domaines TDU et nécessaires à sa fonction activatrice de *pax3*. On peut dès lors supposer que *vgll4* interagit d'autres facteurs de transcription. Il a été montré que *vgll4* interagissait avec le facteur de transcription Mef2 (Chen et al., 2004b) mais cette interaction n'a jamais été montrée chez le xénope. MEF2 (pour **M**yocyte **E**nhancer **F**actor **2**) fait partie de la famille des facteurs de transcription à boîte MADS au nombre de quatre chez les vertébrés (Edmondson et al., 1994). Ils jouent un rôle essentiel dans la myogenèse et la différenciation neuronale (Potthoff and Olson, 2007). Le gène MEF2C est impliqué dans le développement de la crête neurale chez la souris et le

poisson zèbre (Miller et al., 2007; Verzi et al., 2007). Il serait intéressant de déterminer si *vgll4* et *Mef2* interagissent *in vivo* et analyser la fonction du complexe sur la formation de la crête neurale. La protéine *ets1* est un autre facteur de transcription qui pourrait être impliqué dans la fonction de *vgll4*. *Ets1* est exprimé dans les cellules de crête neurale et a été montré comme étant impliqué dans leur migration (Gao et al., 2010; Theveneau et al., 2007). Nous avons montré que *ets1* est capable d'interagir avec *vgll3* *in vivo* (Simon et al., en préparation). Il est donc possible que *vgll4* interagisse aussi avec *ets1* *in vivo* et que sa fonction dépende de ce facteur de transcription.

Vgll4 possède d'autres propriétés dépendantes du facteur yap1

Des études récentes ont montré que Tgi l'homologue de *vgll4* chez la drosophile avait un rôle dans la voie Hippo (Guo et al., 2013; Koontz et al., 2013). La voie Hippo a été décrite pour la première fois chez la drosophile et est impliquée dans la croissance des organes. L'effecteur de cette voie est la protéine YAP1 (Yorkie chez la drosophile) qui est un cofacteur des protéines Tead. L'inactivation de la voie Hippo entraîne la translocation de YAP1 dans le noyau, sa liaison à Tead et l'activation de la transcription des gènes de prolifération cellulaire et anti apoptotique. Ceci conduit à une augmentation de la taille des organes et chez la souris à la formation de nodules cancéreux. Tgi (ou VGLL4) peut entrer en compétition avec Yorkie (ou YAP1) pour sa fixation à Scalloped (ou TEAD) (Guo et al., 2013; Koontz et al., 2013). Nous avons testé les relations qui pouvaient exister entre *vgll4* et YAP1 dans l'embryon de xénope. Il est connu que la surexpression de YAP1 dans l'embryon entraîne une activation ectopique de *pax3* (Gee et al., 2011). Nous avons confirmé ces résultats et, de manière surprenante, la surexpression de *vgll4* avec *Yap1* entraîne une augmentation encore plus forte de l'expression de *pax3*. Les deux protéines ne semblent pas avoir d'effets opposés mais additifs. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la fonction de *vgll4* dans l'activation de *pax3* et la formation de la crête neurale pourrait passer par un autre facteur de transcription que *tead*. Nous avons également montré que *Yap1* était capable de sauver le phénotype des embryons morphants *vgll4* et restaurer l'expression de *pax3*.

Nous avons testé l'impact de *vgl4* sur l'activité transcriptionnelle du complexe YAP1/tead sur le gène rapporteur pGL284-Lucifrase qui comporte un site de reconnaissance M-CAT pour tead (Pasquet et al., 2006). Dans les explants de calottes animales, le complexe YAP1/tead active fortement le gène rapporteur et cette activité est inhibée en présence de *vgl4*. Ces résultats suggèrent que *vgl4* bloque l'activité de YAP1 dans les embryons de xénope comme cela a été montré pour les protéines humaines en cellules en culture (Koontz et al., 2013).

La voie Hippo est impliquée dans de nombreux processus physiologiques tels que la croissance des organes et la régénération tissulaire (Cai et al., 2010; Grusche et al., 2011; Karpowicz et al., 2010; Ren et al., 2010; Shaw et al., 2010; Staley and Irvine, 2010; Sun and Irvine, 2011). Elle agit aussi comme suppresseur de tumeur dans plusieurs cancers humains. Lorsque la voie Hippo est dérégulée ou qu'un de ses composants est inactif (par mutation par exemple), les complexes YAP1/TEAD s'accumulent dans le noyau et activent la transcription des gènes cibles de prolifération cellulaire et d'anti-apoptose qui vont aboutir à la formation de tumeurs (Chan et al., 2008; Fernandez et al., 2009; Steinhardt et al., 2008; Xu et al., 2009; Zhao et al., 2007). Tgi (l'orthologue de *vgl4* chez la drosophile) est impliqué dans la voie Hippo et agit comme inhibiteur de la protéine YAP1. (Guo et al., 2013; Koontz et al., 2013). Chez la drosophile, deux modèles ont émergé pour expliquer le rôle de Tgi dans la voie Hippo. Dans le premier modèle, les niveaux physiologiques de Yki entraînent la croissance normale des tissus en inhibant l'activité répresseur du complexe Tgi/Sd (Koontz et al., 2013). L'autre modèle repose sur l'hypothèse que les protéines Tgi et Yki entrent en compétition pour la liaison à Sd, de manière dépendante de leur concentration (Guo et al., 2013).

Plusieurs travaux soulignent le rôle suppresseur de tumeur de VGLL4 dans les cancers humains du poumon et du pancréas (Mann et al., 2012; Zhang et al., 2014b) et montrent que dans les cellules cancéreuses VGLL4 inhibait le complexe YAP-TEAD (Zhang et al., 2014b). Dans l'embryon de xénope, *vgl4* peut inhiber l'activité transcriptionnelle du complexe YAP1/TeaD sur un gène rapporteur selon un schéma équivalent à la fonction de VGLL4 dans la voie Hippo. Par contre, *vgl4* n'inhibe pas l'activation du gène *pax3* induite par YAP. Ceci suppose des effets distincts de *vgl4* dépendent du gène cible et des partenaires pour former les complexes

transcriptionnels. Puisque les embryons morphants *vgll4* et *YAP1* ont le même phénotype en ce qui concerne l'expression de *pax3*, on peut supposer que les deux protéines agissent dans des voies parallèles ou en synergie pour la formation de la crête neurale. Très récemment, il a été montré que la voie Hippo était impliquée dans la régulation de la différenciation des muscles lisses dérivés des cellules de la crête neurale (Manderfield et al., 2015). Dans ce cas, YAP1 interagit avec le domaine intracellulaire de NOTCH pour activer l'expression de Hes1 (*hairy1*) et stimuler la différenciation musculaire lisse indépendamment de son interaction avec TEAD. Il serait intéressant de déterminer si *vgll4* interagit avec la voie Notch de manière similaire et quel est son effet sur la différenciation musculaire lisse chez xénope dans le modèle qui a été développé au laboratoire (Barillot et al., 2008).

Chapitre 2 : *Vestigial-like 3* est impliqué dans la migration de la crête neurale et la formation du nerf trijumeau

Résumé des travaux

Mes travaux sur la fonction de *vestigial-like 3* (*vgll3*) dans le modèle xénope sont présentés dans l'article en préparation qui suit. Les travaux antérieurs du laboratoire ont décrit la situation de la famille des gènes *vgll* chez le xénope et ont montré que le gène *vgll3* était un marqueur spécifique du rhombomère 2 du cerveau postérieur de l'embryon (Fauchaux et al., 2010). Le système nerveux central est à l'origine de trois vésicules primitives dont le rhombencéphale ou futur cerveau postérieur. Le rhombencéphale subit une segmentation, dépendante des gènes homéotiques et forme les rhombomères. A partir de ces rhombomères, vont migrer les cellules des crêtes neurales qui se situent à la frontière entre la plaque neurale et le futur épiderme. Les cellules qui dérivent du cerveau postérieur migrent selon trois segments appelés arc branchiaux et sont à l'origine, en autres, de la formation du cartilage ainsi que des nerfs et des muscles de la face.

Nous avons étudié la régulation de *vgll3* lors de la formation du cerveau postérieur et sa régulation au cours du développement embryonnaire. *Vgll3* est exprimé à partir du stade 12 et son expression est restreinte au territoire du rhombomère 2 du cerveau postérieur. La mise en place du cerveau postérieur dépend de plusieurs voies de signalisation telles que le FGF et l'acide rétinoïque qui établissent l'expression des gènes homéotiques *hox* selon l'axe antéro-postérieur (Alexander et al., 2009; Maden, 2001). Nous avons montré que l'expression de *vgll3* dans le rhombomère 2 était régulée positivement par le FGF et négativement par l'acide rétinoïque et les gènes *hoxa2* et *hoxb2*. *Vgll3* étant exprimé dans le cerveau postérieur, nous avons étudié sa fonction dans la neurogenèse par des stratégies de perte de fonction et de gain de fonction. *Vgll3* est nécessaire à la neurogenèse et en particulier, à la formation du nerf trijumeau qui représente le principal nerf de la sensibilité de la face.

Les cellules de la crête neurale, qui ont pour origine le rhombomère 2, vont former le premier arc branchial (Lumsden et al., 1991; Sechrist et al., 1993). Il est établi que *pax3* et *zic1* sont essentiels à la spécification, la différenciation et la migration des cellules de la crête neurale crâniale (Milet and Monsoro-Burq, 2012). Vgll3 est un puissant activateur de l'expression des gènes *pax3* et *zic1* *in vivo* dans l'embryon et dans des explants de calottes animales. Vgll3 est également impliqué dans la migration des cellules de la crête neurale et dans la formation du cartilage et des muscles de la tête. Ceci est en corrélation avec la diminution de l'expression des gènes cadhérine à la fois dans les expériences de gain de fonction et de perte de fonction.

Vgll3 appartient à famille protéines vestigial-like cofacteurs des facteurs de transcription Tead. Plusieurs études ont montré *in vitro* l'interaction physique entre Tead et les protéines vestigial-like (Gunther et al., 2004) mais l'interaction entre Vgll3 et Tead n'a jamais été montrée *in vivo*. Nos expériences démontrent que Vgll3 interagit avec tead1 et tead2 dans l'embryon de xénope. Cependant, cette interaction ne semble pas suffisante pour expliquer nos résultats expérimentaux. Nous avons identifié par co-immunoprécipitation la protéine ets1 comme un nouveau partenaire de vgll3 dans l'embryon. La surexpression combinée de *vgll3* et *ets1* dans des cellules humaine en culture induit l'activation d'un gène rapporteur qui est sous la dépendance de *cis*-régulatrices ets. Nos travaux montrent pour la première fois, qu'une protéine Vestigial-like est capable de se lier à des facteurs de transcription autres que Tead. En conclusion, *vgll3* a un rôle majeur dans la neurogenèse et la migration des crêtes neurales et la part respective de Tead et/ou ets1 en lien avec *vgll3* dans ces deux processus reste à définir.

Article 2

VESTIGIAL-LIKE 3 is involved in cranial neural crest migration and interacts with ets1

Emilie Simon ^{1,2}, Pierre Thiébaud, Sandrine Fédou ^{1,2}, Nadine Thézé ^{1,2, #} and Corinne Faucheux ^{1,2, #}

¹ Univ. Bordeaux, F-33076, Bordeaux, France

² CNRS, UMR 5164, F-33076 Bordeaux, France

Note: Co-senior authors

*Address correspondence to: Dr. Corinne Faucheux. UMR CNRS 5164, Université Bordeaux, 146 rue Léo Saignat 33076 Bordeaux, France. Tel : + 33-557-579-265. Fax: +33-557-571-472. e-mail: corinne.faucheux@u-bordeaux2.fr.

RUNNING TITLE: Function of *vgll3* in development of craniofacial structures and interaction with ets-1 factor.

KEYWORDS: Vestigial-like, *Xenopus*, cranial neural crest, ets1, tead.

ABSTRACT

The vertebrate neural crest (NC) is a unique migratory embryonic cell population that forms at the border between the neural plate and the future epidermis. Several molecules have been implicated in the induction of NC. To give rise some of head structure, NC cells migrates in three segmental streams adjacent to contiguous segments called rhombomeres (r). Recently, we have identified a specific marker of r2 in *Xenopus laevis*, *vestigial-like 3* (*vgll3*). We focused our studies on *vgll3* regulation in the hindbrain and its function during *Xenopus laevis* development. We observed that *vgll3* is specifically regulated in the r2 by positive and negative signaling molecules as pax3/zic1 factors or retinoic acid respectively. Defects observed in muscle and cartilage showed the essential role of *vgll3* in head structure development. Moreover, we demonstrated its function in trigeminal nerve development. Vgll3 highly induced expansion of pax3-expressing cells. A potential transcription factor involved is TEAD (TEA/ATTS domain) family as we showed that the cofactor *vgll3* forms a molecular complex with TEAD factors in *Xenopus*. However, we suggested the implication of another transcription

factor involved in NC induction, *ets1* transcription factor that induced *pax3* cell expansion as observed with *vgll3* overexpression. The physical interaction is showed between *Vgll3* and *ets1* by immunoprecipitation and functional interaction is observed in animal caps and luciferase assay. In conclusion, we proved the role of *vgll3* in head structure development with the collaboration of *teads* and the identification of a new partner, *ets1* in NC expansion.

INTRODUCTION

The vertebrate neural crest (NC) is a unique migratory embryonic cell population that forms at the border between the neural plate and the future epidermis. Several molecules have been implicated in the induction of NC. In *Xenopus*, co-injection of BMP (Bone Morphogenetic Protein) antagonists with molecules as Wnts (Wnt7b or Wnt8), fibroblast growth factors (eFGF or bFGF) or retinoic acid results in strong neural crest formation in ectodermal explants (animal caps) (Chang and Hemmati-Brivanlou, 1998; LaBonne and Bronner-Fraser, 1998a; Mayor et al., 1995; Villanueva et al., 2002). Moreover, paraxial mesoderm can induce NC formation in the ectoderm of amphibian implicating FGF signals (Litsiou et al., 2005; Monsoro-Burq et al., 2003). These inductive signals activate neural plate border specifier genes(like *zic*, *msx1* and *pax3/7*) that, in turn, may control the induction of the NC specifiers (like *snail2* and *FoxD3*) (Hong and Saint-Jeannet, 2007; Meulemans and Bronner-Fraser, 2004; Monsoro-Burq et al., 2005). After induction, this transitory cell population undergoes an epithelial-to-mesenchymal transition and migrates into several locations. The migration of NC cells requires a combination of interactions between cells and the surrounding environment or the extracellular matrix. Cadherins, like PCNS, constitute a group of important molecules involved in that process (Halloran and Berndt, 2003; Rangarajan et al., 2006; Theveneau et al., 2007).

Depending on their location, NC cells have the potentiality to give rise to a large variety of derivatives including sensory, sympathetic and enteric neurons, glia, melanocytes, dermis and connective tissue. The most anterior NCC are called cranial neural crest (CNC) and play an important role in determining the shape of the vertebrate head, as the source of most of the cranial bone and cartilages, as well as some of the musculature (Grenier et al., 2009; Knight et al., 2003; Noden, 1991). To give rise some of head structures, NC cells migrate in three segmental streams adjacent to contiguous segments of the hindbrain called rhombomeres (r): r2, r4 and r6. These CNC cells populate the first, second and third pharyngeal arches respectively (Lumsden et al., 1991; Serbedzija et al., 1992)}. For example, CNC cells from the anterior stream migrate around the eye vesicle, populate the mandibular arch and contribute to

the formation of the Meckel's cartilage. Moreover, CNC are at the origin of sensory neurons to form, in part, the trigeminal nerve with contribution of ectodermal placode. Trigeminal nerve (nerve V) is the largest cranial nerve and provides the sensibility of the face and mouth. It is composed of three major branches: the ophthalmic nerve, the maxillary nerve and the mandibular nerve. The motoneurons of nerve V are derived from r2 and r3 formed during the segmentation of the hindbrain. In many animal species, *HOX* gene family plays an important role in regulating the specification of positional identities of rhombomeres along the anterior-posterior (A-P) axis during development (Alexander et al., 2009; Krumlauf, 1994). Individual segments of the developing hindbrain express a large array of genes, some having a restricted expression pattern like *Krox20* which marks only r3 and r5 (Chambers et al., 2009; Schneider-Maunoury et al., 1993). Surprisingly, very few gene has been hitherto found to be solely expressed in r2. Recently, we have identified *vestigial-like 3* (*vgll3*) as a highly specific marker of r2 in *Xenopus laevis* embryonic hindbrain (Faucheux et al., 2010). *Vgll3* is a member of the *vestigial* gene family and ortholog to the selector gene *vestigial* that was first described in *Drosophila* (Mann and Carroll, 2002). Four *vgll* genes have been identified in mammals (*vgll1-4*), each of them display distinct patterns of expression in both embryonic and adult tissues (Chen et al., 2004a; Chen et al., 2004b; Faucheux et al., 2010; Maeda et al., 2002a; Mielcarek et al., 2002a; Mielcarek et al., 2009; Vaudin et al., 1999) (Simon et al., 2015 for review). All vestigial proteins are characterized by the presence of the TONDU domain, a highly conserved sequence that mediates their interaction with the transcription factors of the TEAD family, forming a complex that will activate specific target genes (Simon et al., 2015). We have identified two members of the TEAD family gene (*tead1* and *tead2*) in *Xenopus laevis*, and found they regulate the muscle α -tropomyosin gene through a conserved M-CAT binding site (Naye et al., 2007; Pasquet et al., 2006). Whilst *vestigial* proteins have been studied in great depth in *Drosophila*, we still have sketchy knowledge of the functions of vestigial-like proteins during vertebrates development (Simon et al., 2015).

Here, using *Xenopus* as a model we examine the function of *vgll3* during early development. We find that both gain and loss of *vgll3* expression impairs trigeminal nerve development and cranial neural crest cell migration. We show that *vgll3* can activate *pax3* and *zic1* expression not only in whole embryo but also in animal cap explants. *Vgll3* can interact with *tead1/2* in the embryo but this interaction alone cannot explain *pax3* activation suggesting

potential other interacting protein. Consistent with this hypothesis, we identify ets1 as a new partner of vgl3 that can account for pax3 sustained expression in the embryo.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids and probes

Plasmid containing cDNAs encoding *X. laevis* vgl2 (IMAGE clone 4930090, accession number BC056001) and ets1 (IMAGE clone 8549297, NM_001087613) were obtained from Geneservice and Source BioScience respectively. cDNA encoding *X. laevis* vgl3 (XL405a05ex, accession number BP689606) was obtained from the National BioResource Project (<http://www.nbrp.jp>). 5' sequence of vgl3 mRNA was obtained by 5'RACE (Invitrogen). *Xenopus pax3A* and *zic1A* inducible expression vector were a generous gift of Dr. Monsoro-Burck. Plasmids for *in situ* hybridization *pcdh18* (Tazumi et al., 2010), *PCNS* (Rangarajan et al., 2006) and *myosinX* (Nie et al., 2009) were generous gifts.

Plasmid constructions

Fusion constructs of vgl3 with HA tag were generated by polymerase chain reaction (PCR). Two constructs were obtained. Complete sequence (with upstream sequence of ATG) obtained using 5'-GCGCGGATCCGGTGCCACTAGACAGCAGTTCTGCG-3' and 5'-CGCCTCGAGTCAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTAGTGACACATACCTGTC TCAA-3' primers for PCR (in bold, morpholino sequence and the HA tag sequence is underlined) was cloned in pCS2 using enzyme site (in italic) and used as positive control for morpholino inhibition strategy (*vgl3*). The second construct cloned in pCS2 was performed using a different forward primer 5'- GCGCGGATCCACACTTGCAatgAGTTGTCTGG-3' for PCR (lowercase letters indicate the start codon) and was used as negative control for morpholino inhibition strategy (*vgl3mis*). *Tead1-myc*, *tead2-myc* and *ets-1-myc* constructs were performed using pCS2 including c-myc tag. *Vgl2-HA* and *vgl3-HA* were constructed by RT-PCR using reverse primers including *HA tag sequence* and cloned into pCS2 plasmid. The V3ΔTDU construct was generated by PCR. In brief, two PCR fragments were generated in order to exclude the TDU domain, and were ligated together to be cloned into pCS2-HA as the wild type.

***Xenopus* embryo injections, embryo treatment and explant cultures**

Xenopus laevis embryos were obtained using current protocols (Sive et al., 2000). Embryos were staged according to Nieuwkoop and Faber tables (Nieuwkoop and Faber, 1975). *Noggin* (500 pg), *FGF8* (100 pg), *hoxa2* (70 pg), *hoxb2* (50 pg), *pax3GR/zic1GR* (100 pg each), *vgll3* (0.25-1 ng), *vgll3mis* (0.5 ng), *vgll2* (1 ng), *tead1* (c-myc tag, 50 pg), *tead2* (c-myc tag, 50 pg) and *ets-1* (c-myc tag, 1 ng) mRNAs were synthesized *in vitro* by using the Message Machine kit (Ambion, Austin, TX). For retinoic acid (RA) (Sigma), embryos were treated at stage 8 with 10^{-6} M to 10^{-8} M or with DMSO for control. Pax3GR and zic1GR-injected embryos were cultured in 0,1 X normal amphibian medium (MMR) containing or not 10 μ M dexamethasone (dex) from stage 10.5. Siblings injected with these constructs and cultured in the absence of dex were used as control. For knockdown experiments, morpholino (MO) antisense oligonucleotide was supplied by GeneTools Ins., as follows, *vgll3* MO (v3MO): GGTGCCACTAGACAGCAGTTCTGCG, *tead1* MO (T1MO): CTCCAAGTCTCGGCTC CATGATTG, *tead2* MO (T2MO): AGGGTAAGGAGAGGCTCCTCCAAGC, control MO (cMO): CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA.

Synthetic mRNAs were injected with 250 pg of β -gal (lacZ staining) or *gfp* mRNA as a lineage tracer into the animal pole of one blastomere at the two-cell stage for *in situ* hybridization or immunoassays. For animal cap assay, both blastomeres of two-cell stage embryos were injected into the animal pole region. Animal caps were then dissected from early stage 9-10 injected embryos and cultured until appropriate stages before RNA extraction. When indicated, animal caps were treated with FGF2 at 50 ng/ml (R&D systems). Animal cap assay and RT-PCR analysis were performed as previously described (Naye et al., 2007). All results shown are representative of at least two independent experiments.

Whole mount *in situ* hybridization and immunostaining

Whole-mount *in situ* hybridization was carried out with full length anti-sense probes labelled with digoxigenin corresponding to indicated gene sequences and visualized with BM purple staining (Boehringer) (Harland, 1991). For double *in situ* hybridization, probes were visualized sequentially with the corresponding specific alkaline phosphatase conjugated antibody using first Fast Red (Boehringer) for DIG labeled anti-sense probe and then BMP purple (Boehringer) for the fluorescein-labeled anti-sense probe. For serial sections, embryos were post fixed in MEMFA for 1 h at RT and embedded in paraffin before sectioning. For immunostaining, embryos were collected and fixed in MEMFA for 1 h at RT. Antibody staining

was performed following the standard procedures for indirect immunostaining (Sive et al., 2000) using the skeletal muscle-specific antibody 12/101 at 1:30 dilution, 3A10 antibody at 1:20 dilution (Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA) and HNK-1 antibody at 1:100 dilution (Sigma), peroxidase-conjugated anti-mouse IgG+M (Dako), and diaminobenzidine for detection (Sigma). Embryos were bleached in 2-3% hydrogen peroxide, 5% formamide, and 0.5 x SSC.

Western blot

Once stage of development reached, embryos were lysed directly in cold RIPA buffer (PBS, 1% triton, 1% NP40, 0.05% SDS, 1 µg/ml protease inhibitor cocktail (Roche), 1 mM Pefabloc, 20 mM NaF, 1 mM Na vanadate), sonicated and centrifuged 10 min at 10000 rpm. Subsequently, Freon (1,1,2-trichlorotrifluoroethane, Sigma-Aldrich) was used to remove the yolk from the samples, which were then boiled for 5 min and stored at -80°C. Proteins extracted from the equivalent of one embryo were loaded on 12% SDS-PAGE and transferred on nitrocellulose membranes. Proteins were reacted with the antibodies [mouse anti-HA (Covance, clone 16B12, 1/1000), mouse anti-c-myc tag (Sigma, 1/7000) and rabbit anti-erk2 (Santa-Cruz biotech, sc-154, 1/500)], as recommended by the manufacturers. The blots were then probed with secondary antibodies (IRDye® 680RD goat anti-mouse IgG and IRDye® 800CW goat anti-rabbit IgG respectively, LI-COR). Blots were scanned at the two corresponding wavelengths using the Li-Cor Odyssey® infrared imaging systems. In some cases, secondary antibodies goat anti-mouse or anti-rabbit peroxidase were incubated to visualize staining using the enhanced chemiluminescence detection kit (GE Healthcare).

***In vitro* translation**

0.5 ng of *in vitro* transcribed mRNAs were translated in Promega lysate reticulocytes according to the manufacturer instructions in the presence of 200 ng of MOs and [³⁵S]methionine. The reaction products were analyzed onto a 12% SDS-PAGE followed by autoradiography.

Alcian blue staining

Stage 47 larvae were fixed in MEMFA for 1 h at RT and dehydrated in 100% ethanol. Fixed embryos were incubated in acidic alcohol (80% ethanol, 20% acetic acid) containing 0.05% alcian blue (Sigma, St Louis, MO, USA) for 3 days and then washed in 95% ethanol for

15 min. Embryos were rehydrated using 75% to 25% ethanol mixed with 2% potassium hydroxide (KOH) and washed in 2% KOH. Embryos were transferred into 2% KOH containing progressive increase of glycerol (20%-60%) for 1 h each and finally washed in 80% glycerol in 2% KOH overnight at RT. The head embryos were dissected to shown cartilage structure and embedded in paraplast (Sigma) for serial sections with a microtome.

Migration assay

For cranial neural crest (CNC) cell migration *in vitro* assay, both blastomeres of two-cell stage embryos were co-injected into the animal pole region with *vgll3* mRNA (1 ng) or MOs (v3MO or cMO, 40 ng) with *gfp* mRNA (250 pg, or 1ng alone for control). Only GFP-labelled embryos were selected at neurula stage. CNC explants from stage 17 injected embryos were dissected as previously described (Theveneau et al. 2010 dev cell) and were then plated on bovine plasma fibronectin (10 µg/ml on plastic, Sigma) in 24-well plates, cultured, and imaged in DFA (53 mM NaCl, 5 mM Na₂CO₃, 4.5 mM K gluconate, 32 mM Na gluconate, 1 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂) (Desimone et al., 2005 Methods Mol Biol). Individual CNC explants were photographically documented for up to 18h. Spreading of the explants (ration of spreading, mean ± SD) was measured by comparing the relative surface area at 18 h of culture to 3 h (the time for CNC explants to attach to the coated dishes). The surface area of individual CNC explants was performed using the Image J plugin (<http://rsb.info.nih.gov/ij/features.html>). Student's t-test was done to determine significance of the effects of *vgll3* mRNA (n=15) compared to *gfp* mRNA (n=19) injections and the effect of v3MO (n=24) compared to cMO (n=12) injections. A p value of 0.05 or less (Student's unpaired two-tailed t-tests) was considered significant.

TUNNEL

TUNNEL assay on whole embryos was done using the protocol previously described (Hensey and Gautier, 1997).

RNA extraction and RT-PCR analysis

RNA extraction and RT-PCR analysis were performed as previously described from *Xenopus* embryos (Naye et al., 2007) or from mammalian cells (Treguer et al., 2009) with the primer pairs listed in supplemented data (Fig. S1).

Immunoprecipitation

Embryos were injected in both blastomeres of two-cell stage embryos into the animal pole region. Once stage of development reached, 20-30 injected embryos were frozen on dry ice prior to lysis in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40 together with 1 mM PMSF and a proteinase inhibitor cocktail (Roche). Solubilized proteins were pre-cleared with protein A sepharose beads (Sigma) and incubated with appropriate antibodies (2 µg) [mouse anti-HA (Covance, clone 16B12) or mouse anti-c-myc tag (Sigma)] for 1 h at 4°C and then incubated with protein A sepharose beads for 1 h at 4°C. Agarose beads were spun and washed in cold lysis buffer several times, then boiled in SDS sample buffer before loading onto 10% SDS-PAGE gels. Proteins were immunoblotted and stained with anti-c-myc (1/7000) or anti-HA (1/1000) antibodies. Bound antibodies were detected with HRP-conjugated secondary antibodies (EasyBlot kit anti-mouse IgG; Gene Tex) diluted at 1/1000 in EasyBlocker solution (Gene Tex) to minimize background from protein A contamination, and visualized using the enhanced chemiluminescence detection kit (GE Healthcare).

Transient transfections and reporter gene analysis

pGL284LUC and pGLMCATLUC plasmids have been previously described (Pasquet et al., 2006). All plasmids used for cell transfection were purified using Nucleobond® Xtra endotoxin-free (Macherey Nagel, Duren, Germany). 24 h before transient transfection, HEK293 human kidney cells were seeded on a 24-well plate at 6×10^4 cells/cm² in duplicate in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5% fetal calf serum (FCS) (Invitrogen). Cells were co-transfected with a TK-driven renilla construct (pRL-TK, Promega; 500ng/wells) for normalization of transfection efficiency, together with the pGL284LUC or pGLMCATLUC constructs (500ng/wells) in addition or not of DNA constructs expressing tead1, vgl13, ets1 or vgl13ΔTDU cloned in pCS2-myc tag or pCS2-HA tag as described above (500ng/wells each). Transfection assay was performed using X-treme gene (Roche) according to the manufacturer instructions (ratio 1:1). After 48h of culture, cells were lysed in 150 µl 1 x Lysis buffer (Dual Luciferase Kit, Promega). Luciferase activity was determined from 10 µl of the supernatant, according to the manufacturer's instructions, and quantified with a Varioskan® Flash (Thermo Fisher Scientific). Relative firefly luciferase activity (RLU) was normalized with Renilla luciferase activity in cellular lysates. The presented results are calculated from duplicate samples of at least three independent biological repeats.

Statistical analysis

Quantitative data are presented at the mean \pm SEM and were analyzed using Student's test. Statistical significance was defined at $P < 0.05$.

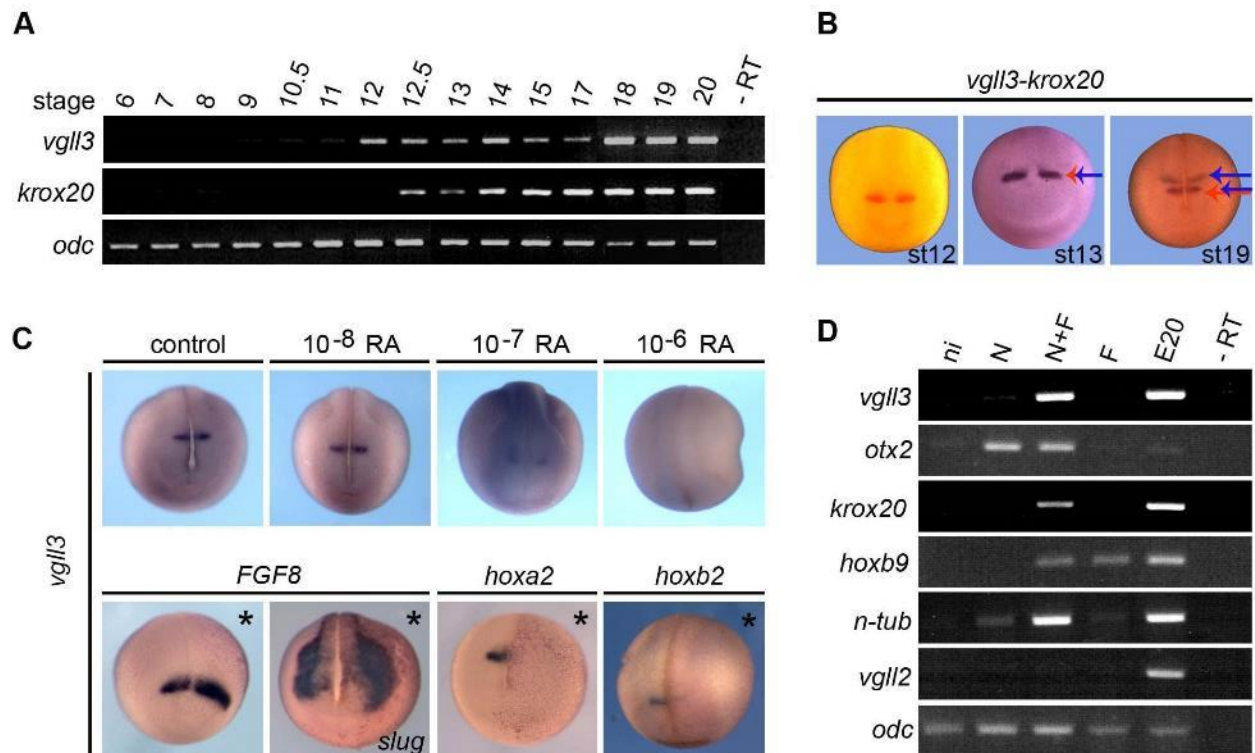


FIGURE 1

Temporal expression and spatial regulation of *vgl3* in *Xenopus*.

(A) RT-PCR analysis of *vgl3* in embryo from stage 6 to stage 20. (B) Double *in situ* hybridization for *vgl3* (red staining) and *krox20* (blue staining). Red arrow and blue arrow correspond to *vgl3* and *kox20* respectively. (C) *In situ* hybridization analysis of *vgl3* expression in embryos treated with increasing concentration of retinoic acid (RA) or injected with *FGF8* (100 pg), *hoxa2* (70 pg) or *hoxb2* (50 pg) mRNAs. As control, *snail2* expression has been analysed in embryos injected with *FGF8* mRNA. All views are dorsal-anterior. Asterisk (*) indicates the injected side of the embryos (red β -gal staining). (D) RT-PCR analysis of animal caps treated with FGF (F, 50 ng/ml) or derived from embryos injected with *noggin* (N, 500 pg) and treated with FGF (N/F). E20, RT-PCR control on stage 20 total embryo RNA ; -RT, RT-PCR control without cDNA; ni, animal cap from uninjected embryo. *Ornithine decarboxylase* (*odc*) gene expression is used as control.

RESULTS

Restricted spatial expression of *vgll3* depends on multiple factors

We have previously identified four *vestigial-like* (*vgll*) genes in *Xenopus* and showed there are highly conserved with their mammalian counterparts (Faucheux et al., 2010). Among them, *vgll3* has a unique expression pattern during early development and in early neurula embryo (stage 13) where it strictly marks rhombomere 2 (r2) of the hindbrain (Faucheux et al., 2010). In those experiments, we did not determine accurately the onset of *vgll3* expression after mid blastula transition. We therefore performed a RT-PCR analysis from 2-cell stage to stage 20 narrowing to very close stages between stage 10.5 and 15. *Vgll3* mRNA started to be detected in stage 12 embryo while *krox20*, that will mark r3 and r5, is first detected in stage 12.5 embryo (Fig. 1A). *Vgll3* expression is detected by *in situ* hybridization in stage 12 as a single stripe (Fig. 1B). In stage 13, *vgll3* and *krox20* (red and blue staining respectively) are co-localized in a single stripe with a faint *krox20* labeling of the prospective neural crest cells that are associated with future r5 (Fig. 1B). In later stage 19 embryo, *vgll3* expression is clearly delineated from *krox20* expression which marks r3 and r5 as expected (Fig. 1B). Therefore, *vgll3* is one of the earliest markers of the hindbrain and to our knowledge the only one whose expression is restricted to rhombomere 2. Such a peculiarity makes of it a good model for studying its regulation and its function in relation with hindbrain anterior patterning.

Patterning of the hindbrain depends on an intricate complex regulation network involving signaling pathways, such as fibroblast growth factor (FGF) and retinoic acid (RA) that establish a *Hox* code along the anterior-posterior axis of the hindbrain (Alexander et al., 2009). Levels of RA vary along the anterior-posterior axis of the hindbrain and *Xenopus* embryos treated with increasing amounts of RA displayed loss of anterior hindbrain structures (Papalopulu et al., 1991). We examined the effect of the exposure of embryos to RA on *vgll3* expression. Embryos treated with RA ranging from 10^{-8} M to 10^{-6} M showed a dose-dependent inhibition of *vgll3* expression with a complete inhibition at 10^{-6} M (100%, n=20, Fig. 1C). We next evaluated the effect of FGF signaling on *vgll3* expression. Embryos were injected with *FGF8* mRNA injection into one blastomere at 2-cell stage and fixed at stage 18 and analysed for *vgll3* expression by whole mount *in situ* hybridization. As already reported, embryos injected with *fgf8* mRNA showed an expansion of *snail2* expression domain (Fig. 1C, (Fletcher et al., 2006). In embryos injected with *fgf8* mRNA, *vgll3* expression is expanded laterally and anteriorly on the injected side at the level of rhombomere 2 (100%, n=40, Fig. 1C).

This mimics the observations made on the effect of FGF8 overexpression on *krox20* expression at the level of rhombomere 3 (Fletcher et al., 2006).

We next determined whether *vgll3* expression could be regulated by *hox* genes. The anterior limits of *hoxa2* and *hoxb2* expression in the vertebrate hindbrain are r1/r2 and r2/r3 borders respectively (Baltzinger et al., 2005; Moens and Prince, 2002; Nonchev et al., 1996; Schilling et al., 2001). Embryos were injected either with *hoxa2* or *hoxb2* mRNAs, fixed at early neurula stage and analysed for *vgll3* expression. In both cases, embryos showed extinction of *vgll3* expression in r2 on the injected side when compared to the uninjected control side (80% and 75% respectively, n=20, Fig. 1C). Mouse *hoxa2* and *hoxb2* mRNAs gave the same results (data not shown).

We next used the animal cap assay to examine FGF-dependent regulation of *vgll3*. In preliminary experiments, we found that neither FGF8 nor FGF2 induced *vgll3* expression in animal caps (data not shown). Therefore we tested *vgll3* expression in animal caps that were neutralized with the BMP inhibitor noggin. Noggin induces anterior neural fate in animal cap cells whereas FGF2 signal accounts for posterior neural induction (Delaune et al., 2005; Lamb and Harland, 1995). Animal caps made from *noggin* mRNA injected embryos expressed the anterior marker *otx2* but neither *vgll3* nor *krox20* hindbrain markers (Fig. 1D). Animal caps treated with FGF2 expressed the posterior marker *hoxb9* but not *vgll3* or *krox20* (Fig. 1D). Animal caps derived from *noggin* mRNA-injected embryos and treated with FGF2 expressed both *vgll3* and *krox20* (Fig. 1D). In those experiments, neural induction is independent of mesoderm as controlled by the absence of *vgll2* muscle specific expression (Fig. 1D). Together these data suggest that *vgll3* expression in hindbrain rhombomere 2 is positively regulated by FGF signals and negatively by *hox* genes and RA signal.

***Vgll3* regulates trigeminal nerve formation**

We next used a morpholino (MO) antisense strategy to address the functions of *vgll3* during development. We have previously characterized a cDNA clone encoding *Xenopus laevis* *vgll3* that is incomplete in its 5' region (Faucheux et al., 2010). Therefore, we first determined by 5'RACE the complete 5' sequence of the mRNA and then designed a morpholino directed against the 5'UTR of the mRNA (Supplementary material Fig. S1) The morpholino completely blocks the translation of *vgll3* mRNA in the embryo but has no effect either on a synthetic mRNA that contains mismatches in the MO sequence recognition (*vgll3mis*) or on *vgll2* mRNA (Fig. 2A, left panel). A morpholino control (cMO) has no effect on *vgll3* mRNA translation (Fig. 2B).

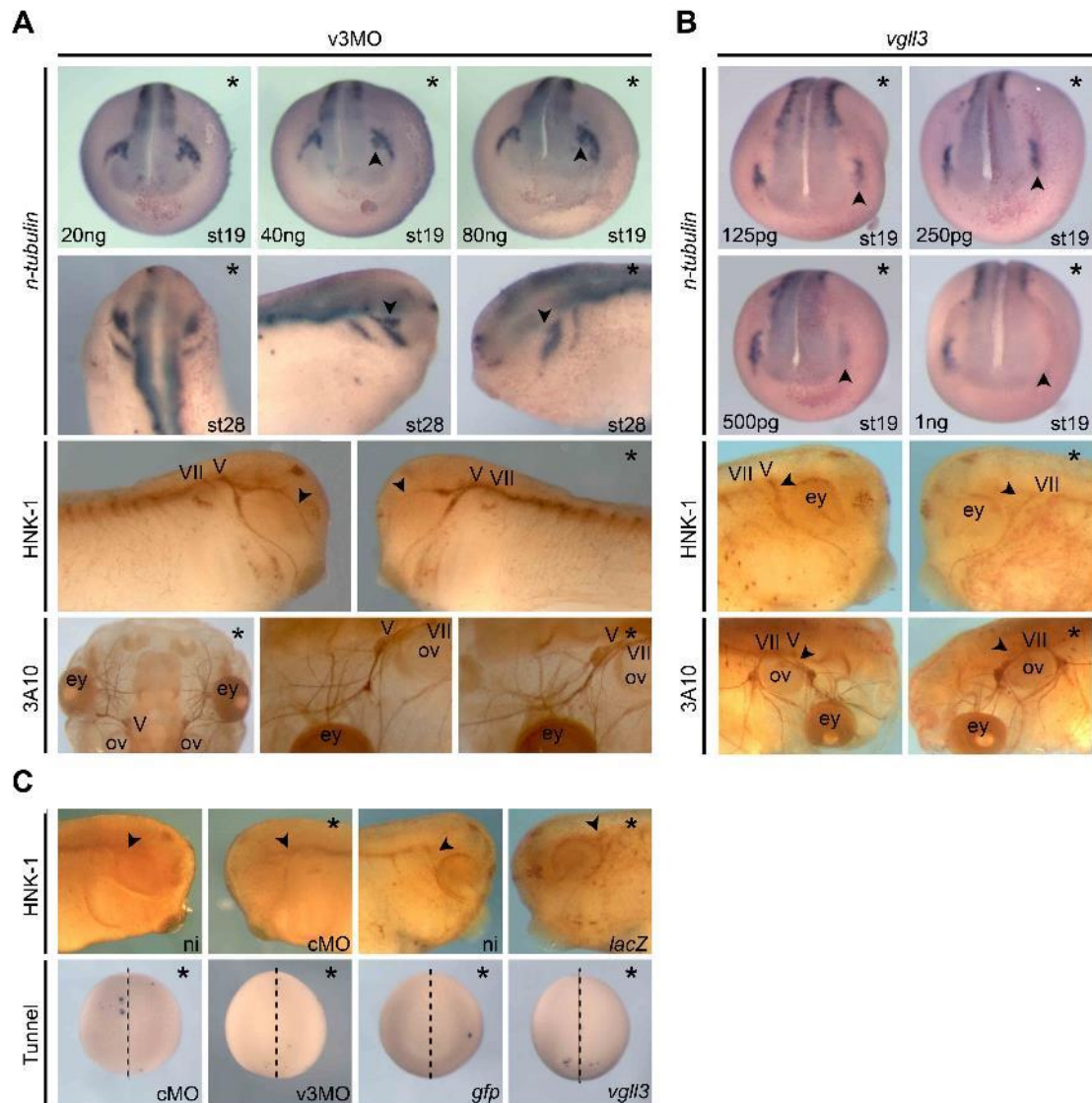


FIGURE 2

***Vgll3* regulates trigeminal nerve formation.**

(A) *In situ* hybridization analysis of *N-tubulin* expression and immunohistochemistry analysis of HNK-1 and 3A10 expression in embryos injected with *vgll3* morpholinos (v3MO). (B) *In situ* hybridization analysis of *N-tubulin* expression and immunohistochemistry analysis of HNK-1 and 3A10 expression from embryos injected with *vgll3* mRNA. (C) Upper row: Immunohistochemistry analysis of HNK-1 expression in embryos injected with control morpholino (cMO) or control *lacZ* mRNA. Lower row: Tunnel analysis of embryos injected with control morpholino (cMO), *vgll3* morpholino (v3MO), *gfp* mRNA or *vgll3* mRNA. The median line of the embryo is indicated with a dotted line. Ey, eye; ov, otic vesicle; V, trigeminal nerve; VII, facial nerve. Asterisk (*) indicates the injected side of the embryos (red β -gal staining).

Because *vgll3* is expressed in the hindbrain, we investigated whether neurogenesis was altered in *vgll3* depleted embryos. *Vgll3* MO were injected into one blastomere at 2-cell stage with a *lacZ* mRNA tracer and developing embryos were fixed at different development stage, stained for β -gal and analysed for post-mitotic neuronal marker *n-tubulin*. Embryos displayed on the injected side a specific alteration in the spatial expression of *n-tubulin* at the level of the trigeminal placode (65%, n=50, Fig. 2C). This effect is dose-dependent (from 40 ng to 80 ng of MO) and is more pronounced in stage 28 embryos where the ophtalmic branch of the trigeminal nerve was almost absent when compared to the control uninjected side (50%, n=20, arrowhead in Fig. 2C). This effect on trigeminal nerve (V) was confirmed with an antibody directed against HNK-1 which is specific of axonal outgrowth (50%, n=30, Fig. 2C). A specific disorganization of the trigeminal nerve in stage 45 morphant embryos was also clearly revealed with the neurofilament specific 3A10 antibody (50%, n=30, Fig. 2C). No change for trigeminal nerve was observed in embryos injected with control MO (cMO, Fig. 2D).

We next determined the effects of *vgll3* gain of function on neural development. Embryos were injected with increasing amounts of *vgll3* mRNA and stage 19 embryos were fixed and analysed for *n-tubulin* expression. Embryos overexpressing *vgll3* mRNA showed a dose dependent decreased in *n-tubulin* expression at the level of trigeminal placode (100% for 1ng of *vgll3* mRNA, n=30; arrowhead in Fig. 2D). In stage 28 embryos, HNK1 labeling of the trigeminal branch has almost disappeared on the injected side when compared to uninjected control side (50%, n=25, arrowhead in Fig. 2D). This is still conspicuous in tadpole stage 45 injected morphant embryos labeled with 3A10 antibody where the major branch of the trigeminal nerve connected to rhombomere 2 was more diffuse and the different branches from trigeminal ganglion had a quivering phenotype very similar to the one observed in morphant embryos (80%, n=25, Fig. 2C). No change of trigeminal nerve was observed in control embryos injected with *lac Z* mRNA (Fig. 2D). The reduction in *n-tubulin* expression in gain- or loss-of function could result from an increased apoptosis. Therefore, embryos injected with *vgll3* MO, or *vgll3* mRNA were allowed to develop to neurula stage when apoptosis was assayed by TdT-mediated dUTP nick end labelling (TUNEL). Injected sides and control non injected sides showed no differences strongly suggesting that gain or loss of *vgll3* function does not induce apoptosis (Fig. 2E).

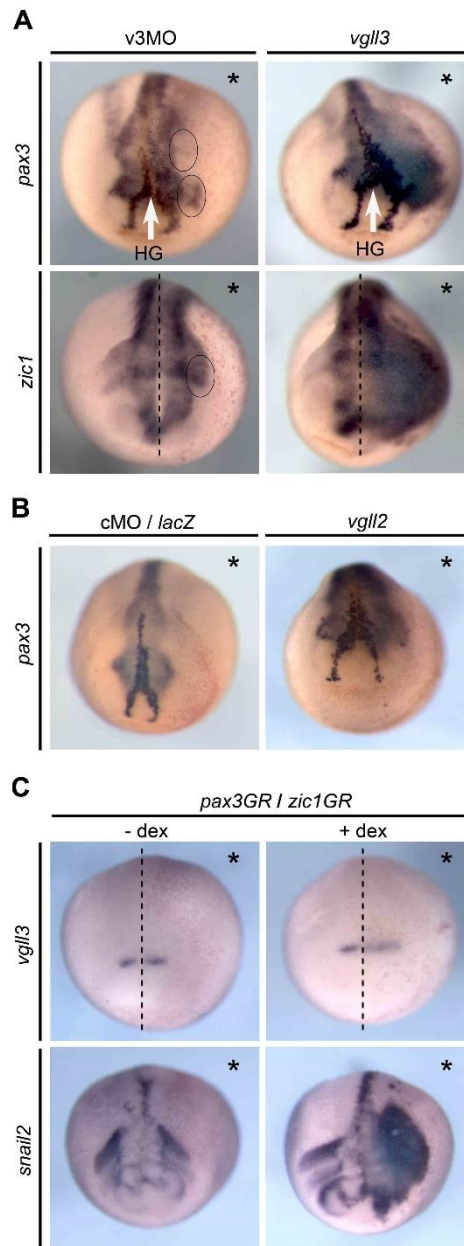


FIGURE 3

***Vgll3* regulates *pax3* and *zic1* expression and regulates neural crest stream segregation and migration.**

(A) *In situ* hybridization of *pax3* and *zic1* expression in stage 19 embryos injected with 40 ng of *vgll3* morpholinos (*v3MO*) or 1 ng of *vgll3* mRNA. The hatching gland and the median line of the embryo are indicated with a white arrow and a dotted line respectively. The limits of neural crest cells lateral streams that have fused or have disappeared are shown in circles. (B) *In situ* hybridization of *pax3* expression in stage 19 embryo injected with 1 ng of *vgll2* mRNA. (C) *In situ* hybridization of *vgll3* and *snail2* expression in stage 19 (*vgll3*) or stage 21 (*snail2*) embryo injected with 100 pg of *pax3GR/zic1GR* mRNAs. -dex, untreated embryo, +dex, embryo treated with dexamethasone; HG, hatching gland. The asterisk (*) indicated the injected side of the embryos (red β -gal staining). All views are dorsal-anterior.

***Vgll3* regulates the formation and migration of cranial neural crest**

All hindbrain rhombomeres produce neural crest cells and those originating from rhombomere 2 will migrate and populate branchial arch 1. In the genetic regulatory network that control neural crest formation, *pax3* and *zic1* have been shown to be essential for specification, differentiation and migration of cranial neural crest cell in *Xenopus* embryos (Betancur et al., 2010; Sechrist et al., 1993).

Both genes are expressed in early to mid-gastrula stage embryo in the so-called neural plate border domain (Hong and Saint-Jeannet, 2007; Monsoro-Burq et al., 2005). We determined if *vgll3* could be involved in *pax3* and *zic1* expression. Embryos were injected with *vgll3* MO into one blastomere at two-cell stage and allowed to develop until stage 19 then fixed and analysed for *pax3* and *zic1* expression. The embryos showed a decrease of *pax3* and *zic1* expression together with an appearance of disorganization at the level of precursors of the hatching gland (90%, n=40; Fig.3A, left panels). In those embryos, the lateral streams of neural crest cells that express *pax3* and *zic1* have either disappeared or have fused (circles in Fig. 3A). No change in *pax3* and *zic1* expression was observed in embryos injected with control morpholinos (Fig. 3B and data not shown).

We next determined the effect of *vgll3* gain-of function on *pax3/zic1* expression. Embryos injected with *vgll3* mRNA showed a strong ectopic expression of *pax3* and *zic1* on the injected side when compared to uninjected control side (100%, n=40 each, Fig. 3A, B right panels and data not shown). In control experiments, no change in *pax3* and *zic1* expression was observed in embryos injected with *lacZ* mRNA. (Fig. 3B and data not shown). *Vgll2* overexpression can also stimulates, albeit more weakly, *pax3* and *zic1* expression (Fig. 3B).

Because *pax3* and *zic1* are expressed earlier than *vgll3* in the developing embryo we examined if they could regulate its expression (Hong and Saint-Jeannet, 2007). Embryos were injected in one blastomere of two-cell stage with mRNA encoding inducible forms of *pax3* and *zic1* and allowed to develop until stage 9 before treatment with dexamethasone (dex) and *vgll3* expression analysis. The efficiency of dexamethasone treatment was confirmed by analyzing *slug* expression which is known to be stimulated by *pax3/zic1* (Fig. 3C) (Milet et al., 2013). Embryos injected with *pax3/zic1* inducible mRNAs showed a lateral expansion of *vgll3* expression after dexamethasone treatment (80%, n=20, Fig. 3C). Together these data suggest that correct levels of *vgll3* expression are key to its function and that *vgll3* regulates *pax3* and *zic1* expression but is also stimulated by *pax3* and *zic1* in a feedback loop.

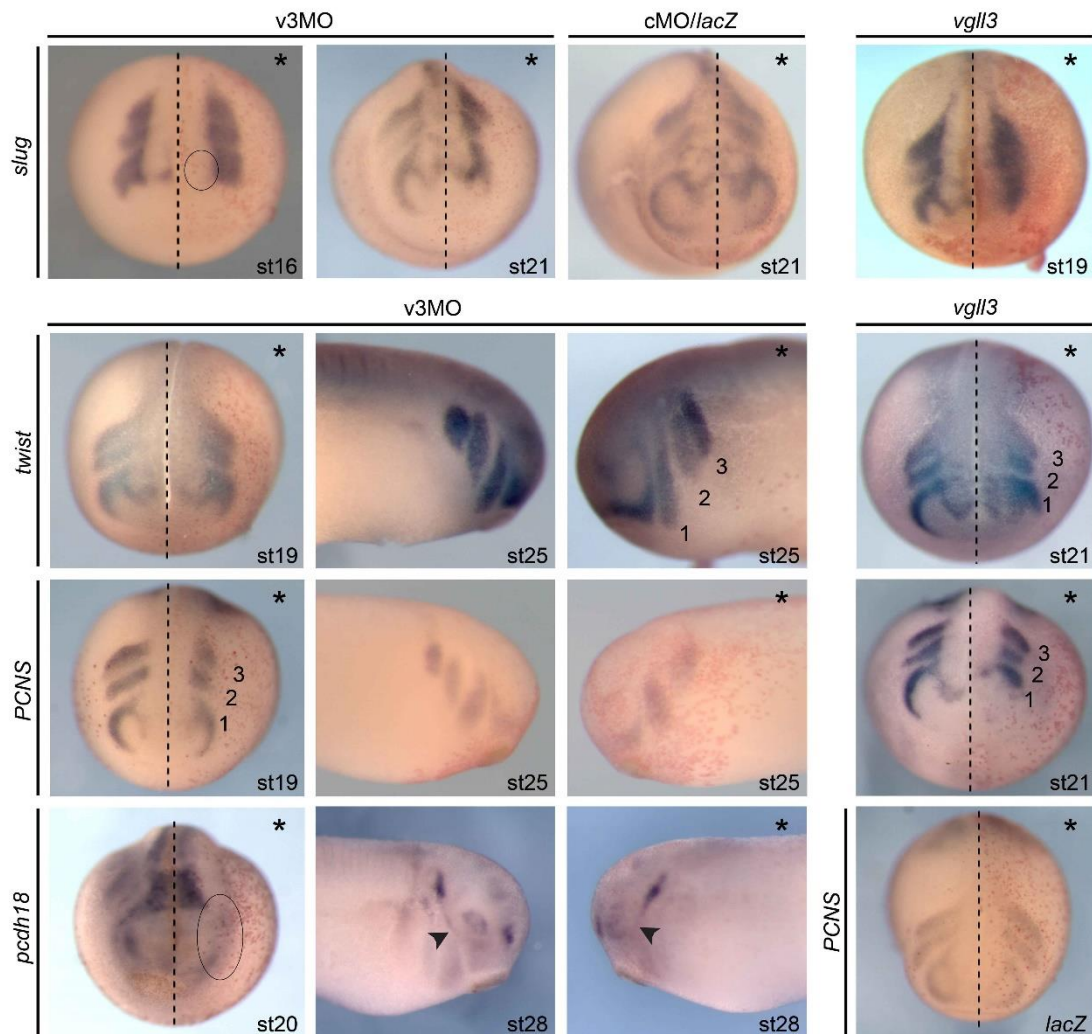


FIGURE 4

***Vgl3* regulates the migration of cranial neural crest *in vivo*.**

In situ hybridization of *snail2*, *twist*, *PCNS* or *pcdh18* in embryos injected with 40 ng of *vgl3* morpholinos (v3MO), 40 ng of control morpholinos (cMO), 1 ng of *vgl3* mRNA or 1 ng of *lacZ* mRNA control. The stream of cranial neural crest cells that will give rise to branchial arches are indicated (1, 2, 3). The mandibular branch of trigeminal nerve is indicated by an arrowhead. Asterisk (*) indicates the injected side of the embryos (red β -gal staining). The midline of the embryo is indicated by a dotted line. Embryonic stage are indicated. All views are dorsal-anterior excepted lateral views for stage 25 and 28 embryos.

Snail2 (or *slug*) is one of the earliest NC specifiers expressed in the embryo followed by *twist* (Lander et al., 2013) (Mayor et al., 1995). We examine their expression in *vgl3* depleted embryos. In stage 16 *vgl3* depleted embryos, part of *snail2* positive cells were absent at the neural plate border on the injected side (90%, n=20, circle in Fig 4). Morphant embryos injected with control MO (cMO) showed no effect on *snail2* expression (Fig. 4). In stage 21 embryos depleted for *vgl3*, where neural crest migration had started, *snail2* expression is clearly less expanded on the injected side compared to the control side (100%, n=50, Fig. 4). Unlike other NC specifier, *twist* expression remains restricted to cranial region and marks mandibular, hyoid and branchial segments (Lander et al., 2013). In stage 19 *vgl3* depleted embryo, there was a reduction of the domain of *twist* expressing cells on their injected side compared to uninjected control side (100%, n=50) and stage 25 embryo showed a much lower expression in branchial arches, more pronounced in the first one (50%, n=30, Fig. 4). These results suggest that *vgl3* depletion impairs neural crest cell migration.

Neural crest cells migration is regulated by cell-cell interaction that is in part mediated by cadherins such as PCNS (protocadherin in neural crest and somites) and *pcdh18* (Rangarajan et al., 2006) (Aamar and Dawid, 2008). We determined what the expression of cadherin was in *vgl3*-depleted embryo. In stage 19 *vgl3*-depleted embryos, PCNS expression domain is less extended along the different streams that will form branchial arches (90%, n=35, Fig. 4) and at stage 25, embryos showed a loss of PCNS expression (54%, n=30, Fig. 4). In stage 20 *vgl3*-depleted embryos, *pcdh18* expression is not detected in the neural crest lateral streams on the injected side (100%, n=30, circle in Fig. 4) and at stage 28 its expression is absent in the mandibular branch of trigeminal nerve (100%, n=20, arrowhead in Fig. 4).

We next examined if *vgl3* gain of function could affect neural crest cell migration. Embryos were injected with 1 ng of *vgl3* mRNA into one blastomere a two cell stage and embryos were allowed to develop until stage 19 or 21 then fixed and analysed by *in situ* hybridization for the different markers. Stage 19 and stage 21 *vgl3*-depleted embryos showed a clear impairment of migration of cells expressing *snail2* and *twist* respectively (100% and 73% respectively, n=40, Fig. 4). CNC cell migration into pharyngeal arches is also inhibited in *vgl3*-depleted embryos as revealed by PCNS expression staining (93%, n=40, Fig. 4).

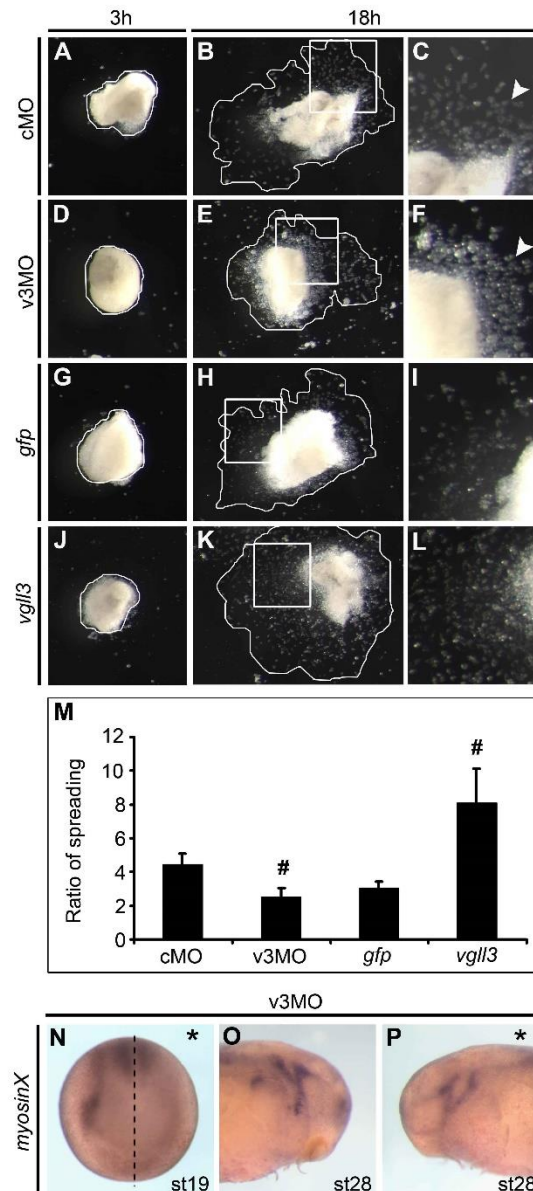


FIGURE 5

***Vgll3* regulates the migration of cranial neural crest *in vitro*.**

Neural crest was dissected from early neurula embryo injected with 40 ng of control morpholinos (cMO), 40 ng of *vgll3* morpholinos (v3MO), 1 ng of *gfp* mRNA or 1 ng of *vgll3* mRNA and cultured *in vitro* on fibronectin for 3 h (A, D, G, J) or 18 h (B, E, H, K). Panels C, F, I and L represent enlarged views of squares in B, E, H and K. M, The ratio of spreading of the explants was measured by comparing the relative surface area between 18 h and 3 h of culture (indicated by the line plot in B, E, H and K). (t test: # $p < 0.05$; experiment, *lacZ* mRNA overexpression showed no effect on *snail2* and *PCNS* expression (Fig. 4 and data not shown). Together these experiments suggest that *vgll3* is required for normal error bars represent standard deviation). N-P, *in situ* hybridization of *myosinX* expression in stage 19 (N) or stage 28 (O, P) embryo injected with 40 ng of *vgll3* morpholino (v3MO). Dorsal- migration of neural crest cells into the pharyngeal branches and regulates expression level of members of *cadherin* gene family. anterior view for stage 19 and lateral view for stage 28 embryo. (*) indicated the injected side of the embryos (red β -gal staining). Midline embryo is indicated by a dotted line.

In control experiment, *lacZ* mRNA overexpression showed no effect on *snail2* and *PCNS* expression (Fig. 4 and data not shown). Together these experiments suggest that *vgll3* is required for normal migration of neural crest cells into the pharyngeal branches and regulates expression level of members of *cadherin* gene family.

Vgll3* regulates cranial neural crest cell migration *in vitro

Our above findings suggest that *vgll3* could be implicated in cranial neural crest cells migration. We further investigated this hypothesis we turned to an *in vitro* assay that relies on the migration of CNC on a fibronectin (FN) substrate (Alfandari et al., 2003). Embryos were injected with *vgll3* morpholino or *vgll3* mRNA into each blastomere at two-cell stage with *gfp* mRNA as tracer. Stage 17 embryos expressing *gfp* in CNC were selected under fluorescent lamp and processed for further analysis. CNC were dissected, plated on FN-coated dishes and migration was monitored over an 18 h period. 3 h after plating, CNC cells attached to the substrate and started to spread (Fig. 5A, D, G, J) 18 h after plating, CNC explants from *vgll3*-depleted embryos displayed a reduced spreading compared to CNC from embryos injected with control MO (Fig. 5E versus B). In contrast, explants from *vgll3* mRNA injected embryos showed an enhanced spreading spread compared to explants from control embryos injected with *gfp* mRNA (Fig. 5K versus 5H). At higher magnification (Fig. 5C, F, I, L), only CNC cells from *vgll3* depleted embryos seemed to show a spreading failure, instead, cells have tendency to dissociate from each other and remain round (Fig. 5F). In some cases, explants from *vgll3* depleted embryos completely disaggregated (30%, data not shown). To quantify cell migration, the area of coherent cell spreading was measured for each explant at the start (3 h) and at the end point of the experiment (18 h). Relative changes in area were calculated as a measure of the ratio of spreading (Fig. 5M). Explants from *vgll3* depleted embryos spread 1.8 less than control explants (injected with cMO) while explants from *vgll3* mRNA injected embryos spread 2.6 more control explants (injected with *gfp* mRNA) (Fig. 5M).

The unconventional *myosinX* has been shown to be critical for cell protrusion and cell-cell adhesion of CNC (Nie et al., 2009).. Embryos depleted for *vgll3* showed a strong reduction in *myosinX* expression level at premigratory (stage 19) and migratory stages (stage 28) respectively (90%, n=30; Fig. 5N-P).

These findings suggest that *vgll3* is required for proper neural crest cell migration through alteration in their spreading and adhesion properties.

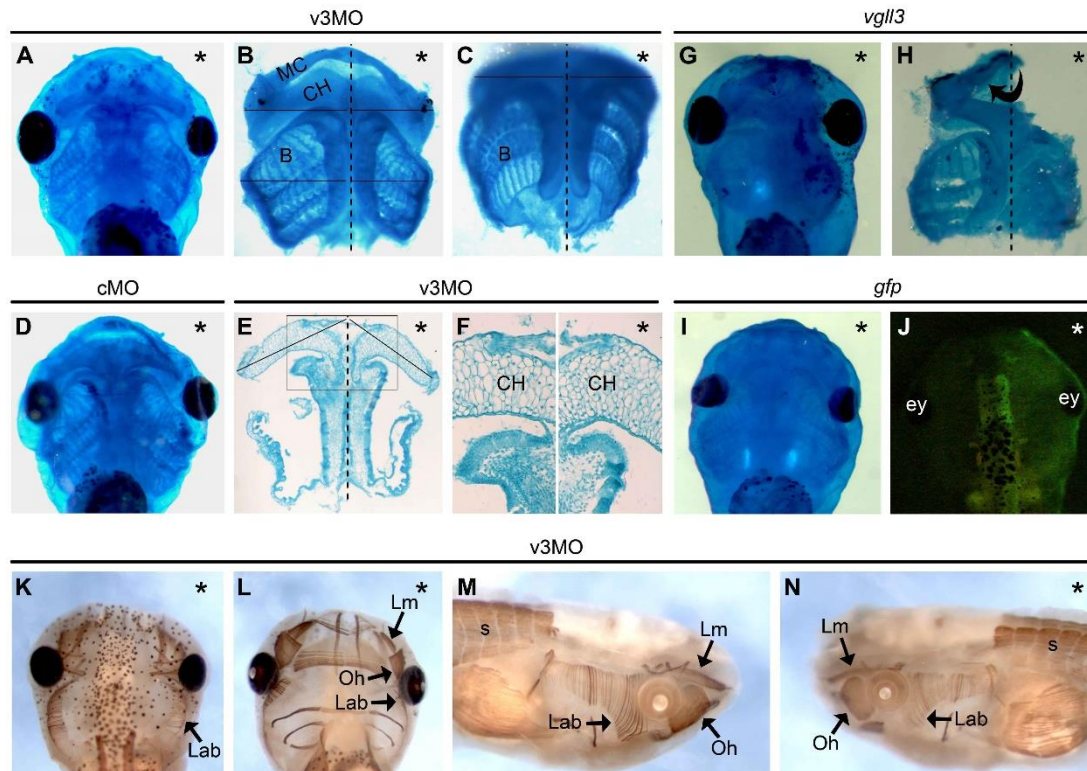


FIGURE 6

***Vgl3* is implicated in the formation of neural crest derivatives.**

Alcian blue staining (A-I) and immunostaining for 12/101 expression analysis (K-N) in embryos injected with 40 ng of *vgl3* morpholino (v3MO), 40 ng of control morpholino (cMO) or 1 ng of *vgl3* mRNA. In B, C, H, dissection of head cartilage. In E, F transversal paraffin sections of head cartilage (F, enlarged view of E indicated in the square line). J, *gfp* fluorescence of control embryo. Ventral views of the cranial cartilage with anterior to the top (A, D, G, I, L) and dorsal views (J, K). The asterisk (*) indicates the injected side of the embryos. Midline embryo is indicated by a dotted line. B, Branchial cartilage; CH, Ceratohyal cartilage; ey, eye; Lab, Levator arcuum branchialium muscle; Lm, Levator mandibulae muscle; MC, Meckel's cartilage; Oh, Orbitohyoideus muscle; S, somatic muscles.

***Vgll3* depletion results in loss of neural crest derivatives**

Cranial neural crest cells are the source of most of the cranial bones and cartilages and play an important role in determining the shape of the vertebrate head. Because *vgll3* is required for proper CNC migration, we further determine if *vgll3* depletion impaired head structure formation. Embryos were injected with *vgll3* MO and *gfp* mRNA into one blastomere at two-cell stage. Embryos were allowed to develop until stage 19 and selected under fluorescent light for unilateral expression of *gfp*. They were then allowed to develop until Stage 47, fixed and stained with alcian blue to reveal cranial cartilages. *Vgll3*-depleted embryos exhibited reduced and abnormal cartilage head morphology on their injected side when compared to control MO embryo (Fig. 6A-C). This even more obvious after dissection and embryos revealed on the injected side a high rate of cranial cartilage hypoplasia including severe loss of Meckel's (MC), ceratohyal (CH) and branchial cartilages (B) when compared to uninjected control side (100%, n=15, Fig. 6B). Transversal sections of paraffin embedded tissues showed that the ceratohyal cartilage on the injected side was shorter than on the uninjected control side (Fig. 6E) and display numerous smaller chondrocytes (Fig. 6F). Embryos injected with control MO showed no alteration in head cartilage (Fig. 6D). Embryos injected with *vgll3* mRNA showed an impaired cartilage development with the ceratohyal cartilage being severely disorganized (100%, n=15, Fig. 6 G, H). In control experiments, embryos injected with *gfp* mRNA showed no change in cartilage head morphology (Fig. 6 I, J).

Craniofacial development requires intricate signaling interactions between neural crest cells and mesodermal cells that ultimately give rise to both cartilage and muscle development (Noden and Francis-West, 2006; Noden and Trainor, 2005). We therefore examined if muscle development was affected in *vgll3* depleted embryos. As before, embryos injected with *vgll3* MO and *gfp* mRNA were selected upon unilateral *gfp* expression and then stained for the muscle specific marker 12/101. *Vgll3* depleted embryos showed specific defects in head muscles including severe loss of levator arcuum branchialium (Lab), levator mandibulae (Lm) and orbitohyoideus (Oh) muscles (90%, n=20, Fig. 5K-N). No significant change was observed in somitic muscles (s).

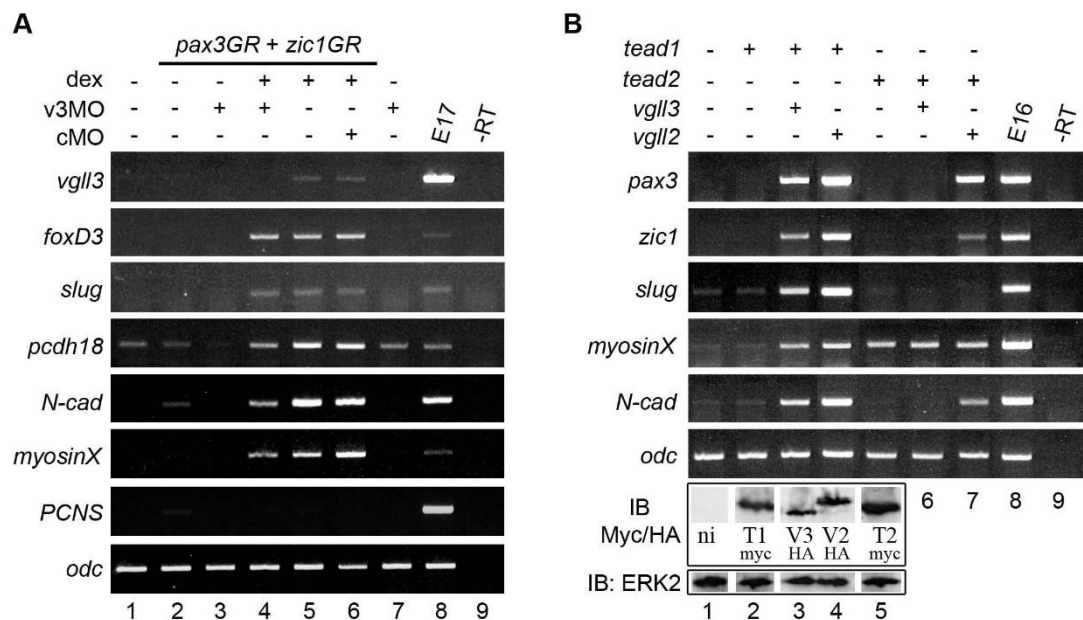


FIGURE 7

***Vgll3* regulates specific subset of genes in animal cap explants.**

(A) Animal caps from embryos injected with 100 pg of *pax3GR/zic1GR* and 40 ng of *vgll3* morpholinos (v3MO) or 40 ng of control morpholinos (cMO) were analysed by RT-PCR for the expression of the indicated genes. -dex, control ethanol-treated embryos; +dex, dexamethasone treated embryos. (B) Animal caps from embryos injected with 50 pg of myc-*tead1*, 50 pg of myc-*tead2*, 1 ng of HA-*vgll3* or 1 ng of HA-*vgll2* mRNAs were analysed by RT-PCR for the expression of the indicated genes. E16, RT-PCR from control stage 16 embryo; -RT, RT-PCR control performed without cDNA. *Ornithine decarboxylase* (*odc*) gene expression is used as control. Lower panel, western blot analysis (IB) of the expression of *tead1* and *tead2* in protein extracts from the corresponding lanes. Erk2 detection is used for loading controls.

***Vgll3* regulates specific subset of genes and interacts with TEAD in the embryo**

The vertebrate vestigial-like proteins, like their drosophila counterpart, are transcriptional co-activators that act through the formation of a complex with members of the TEAD transcription factors family (scalloped in drosophila) activating a large set of genes (Halder et al., 1998) (Simon et al., 2015). As we have shown above, *vgll3* depletion or overexpression, clearly affects the expression of distinct genes in the embryo that are either involved in neural development or neural crest formation and migration. We showed that *pax3/zic1* stimulated *vgll3* *in vivo* but in the meantime, we have found that *vgll3* can regulate *pax3* and *zic1* expression suggesting a complex regulatory interplay between those genes (Fig. 3). We turned to the animal cap assay to get more insights into this complex interplay. Embryos were injected in the two blastomeres with mRNA encoding dexamethasone inducible forms of *pax3* and *zic1* (*pax3GR* and *zic1GR*) in combination with *vgll3* MO. Animal caps were explanted at *blastula* stage, treated with dexamethasone (dex) before RT-PCR analysis of selected genes. As expected, the expression of the CNC markers *foxD3* and *snail2* was stimulated in dexamethasone treated explants but *vgll3* MO did not modify their expression level (Fig. 7A, lanes 4 and 5). This indicates that *vgll3* is not acting in *pax3/zic1* signaling pathway that induces *foxD3/snail2* expression. In contrast, *pcdh18*, *N-cadherin* (*N-cad*) and *myosinX* expression is induced in dexamethasone explants and significantly reduced in the presence of *vgll3* MO (Fig. 7A, lanes 4 and 5). *PCNS* expression was also tested but its low level precluded any detectable changing. Of note, the expression of the muscle regulatory gene *myf5* is also reduced in the presence of *vgll3* MO. In all experiments, no significant effect was observed in cMO injections (Fig. 7A, lanes 5 and 6). We may conclude that *vgll3* regulates genes involved in adhesion and migration of NCC downstream of *pax3/zic1* signaling but it is not essential for CNC induction. We next used the effect of *vgll3* overexpression on gene targets. Because Vgll proteins have been showed to be cofactors of TEAD proteins, animal cap cells were explanted from embryos injected with *vgll3* alone or in combination with *tead* mRNAs. In those experiments, we have used *tead1* and *tead2* mRNAs that are encoded by the two genes we have described in *Xenopus* (Naye et al., 2007). Embryos were injected with different combinations of *vgll3*, *tead1* and *tead2* mRNA animal caps explants were analysed like before. When expressed alone, *vgll3*, *tead1* or *tead2* did not activate any of the genes tested (data not shown and Fig. 7B, lanes 2 and 5). However when *vgll3* is co-expressed with *tead1*, *pax3*, *zic1*, *snail2*, *myosinX* and *N-cadherin* are robustly expressed (Fig. 7B, lanes 2 and 3). The

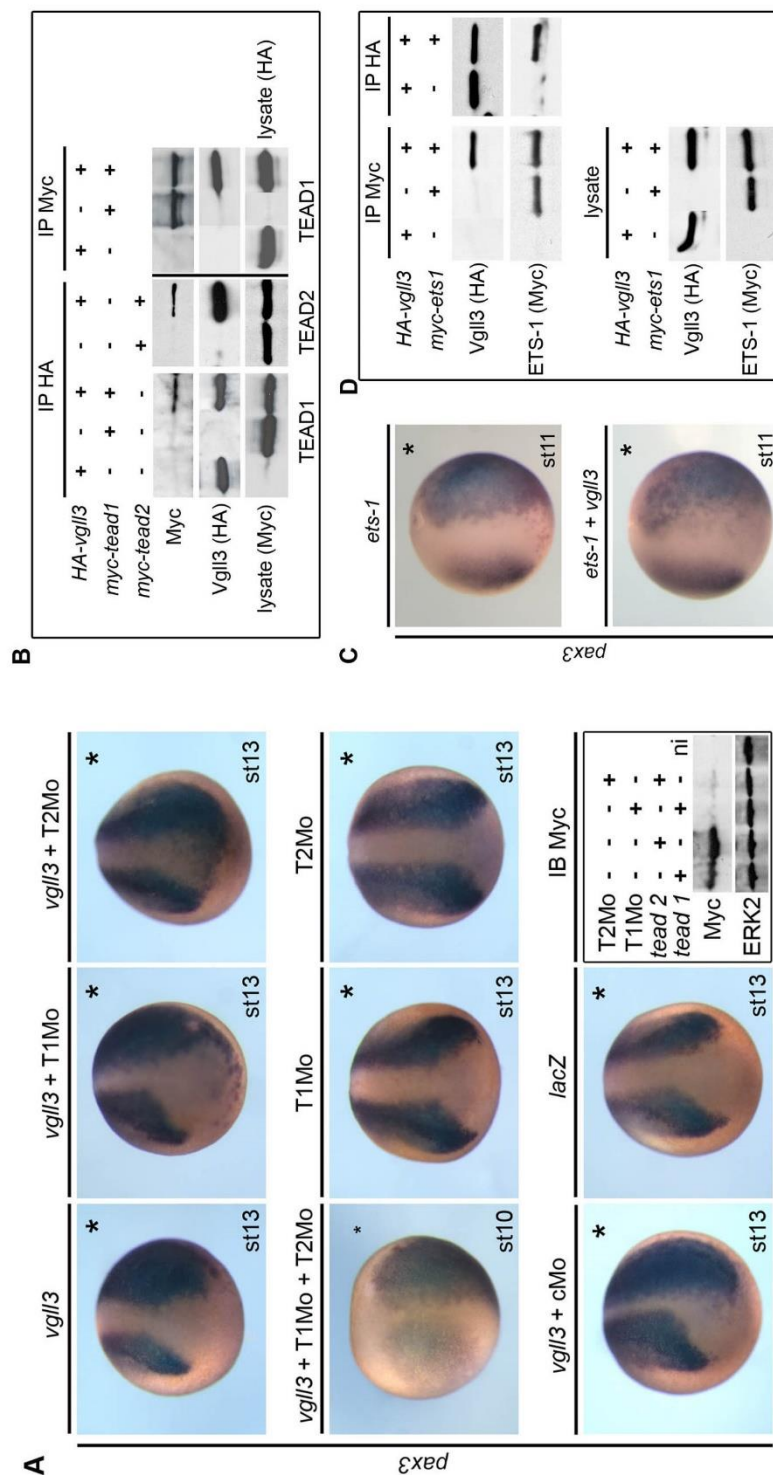


FIGURE 8

Vgll3 interact with TEAD and ETS1 proteins in the embryo.

(A) *In situ* hybridization of *pax3* expression in embryos injected with 1 ng of *vgll3* mRNA and 15 ng of tead1 morpholino (T1MO), 15 ng of tead2 morpholino (T2MO), 15 ng of control morpholino (cMO) or 1 ng of lacZ mRNA. The asterisk (*) indicates the injected side of the embryos. Lower right panel, western blot control analysis of efficiency of morpholinos in embryo injected with 50 pg of tead1 or tead2 mRNA with 40 ng of tead1 morpholino (T1MO) or 40 ng of tead2 morpholino (T2MO). Erk2 is used for loading controls. ni: no injection. (B) Western blot analysis of immunoprecipitation products (IP) from embryos injected with 15 pg of *Myc-tead1*, 15 pg of *Myc-tead2* or 1 ng of *HA-vgll3* mRNA. Lysates, western blot control of injected embryo before IP. (C) *In situ* hybridization of *pax3* expression in embryos injected with 1 ng of *myc-ets1* mRNA and 1 ng of *vgll3* mRNAs. The asterisk (*) indicates the injected side of the embryos. (D) Western blot analysis of immunoprecipitation products (IP) from embryos injected with 1 ng of *myc-ets1* or *HA-vgll3* mRNAs. Lysates, western blot control of injected embryo before IP.

co-expression of *vgl2* with *tead1* gave the same results (Fig. 7B, lane 4). Surprisingly, co-expression of *vgl3* and *tead2* did not stimulate any of the genes excepted *myosinX* (Fig. 7B, lane 6). Surprisingly, co-expression of *vgl2* with *tead2* is able to stimulate all the genes tested, albeit faintly for *snail2*. Western blot analysis (IB) was performed to show similar levels of expressions for Vestigial-like and TEAD proteins in injected embryos (Fig. 7B, lower panel).

Together those results indicate that *vgl3/tead1* and *vgl3/tead2* stimulate distinct genes in embryonic cells. *Tead1* has been previously shown to expand *pax3*-expressing neural crest progenitors in *Xenopus laevis* embryo and *Tead2* to be an endogenous activator of *Pax3* in mouse neural crest cells (Gee et al., 2011; Milewski et al., 2004). We ask whether the observed *vgl3*-dependent stimulation of *pax3* in overexpression studies required *tead1* or *tead2*. Embryos were injected into one blastomere at two-cell stage with 1ng of *vgl3* mRNA and 15 ng of morpholinos directed against *tead1* and *tead2*. The morpholinos efficiently blocked the expression of *tead1* and *tead2* in the embryo as controlled by western blot analysis (Fig. 8A). As shown before, *vgl3* induced strong ectopic activation of *pax3* expression on the injected side of embryo as opposed to control uninjected side (100%, n=50, Fig. 8A). Embryos depleted for *tead1* or *tead2* showed an extended *pax3* expression domain similar to embryos overexpressing *vgl3* alone (100%, n=50, Fig. 8A). This is still the case in embryos depleted for both *tead1* and *tead2* (100%, n=50, Fig. 8A). We next sought to determine if *vgl3* could interact with *tead1/tead2*. Embryos were injected with 1ng of *HA-vgl3* mRNA with 15 ng of either *myc-tead1* mRNA or *myc-tead2* mRNA. Embryos were allowed to develop until blastula stage, then fixed and submitted to immunoprecipitation followed by western blot analysis as before. As shown in Figure 8B, *vgl3* is able to interact with both *tead1* and *tead2* in the embryo. The above finding led us to hypothesize that even in the absence of *tead1* and *tead2*, *vgl3* is still able to activate *pax3* expression in the embryo suggesting that *vgl3* could activate transcription through a *tead*-independent mechanism.

Tead proteins are transcription factors that can bind the so-called M-CAT sequence (5'-AGGAATGT/C-3') present in numerous non-muscle and muscle genes (Pasquet et al., 2006). For instance *Tead* binding sites have been identified in *Xenopus* and mouse *pax3* gene regulatory regions (Gee et al., 2011; Milewski et al., 2004). Surprisingly, the core sequence of TEAD binding site, 5'-GGAA-3', is a perfect recognition sequence for members of the ETS-domain transcription factor family (Sementchenko and Watson, 2000; Sharrocks, 2001). *Ets1*, the prototype of the ETS family, is specifically expressed by CNC cells and is necessary for

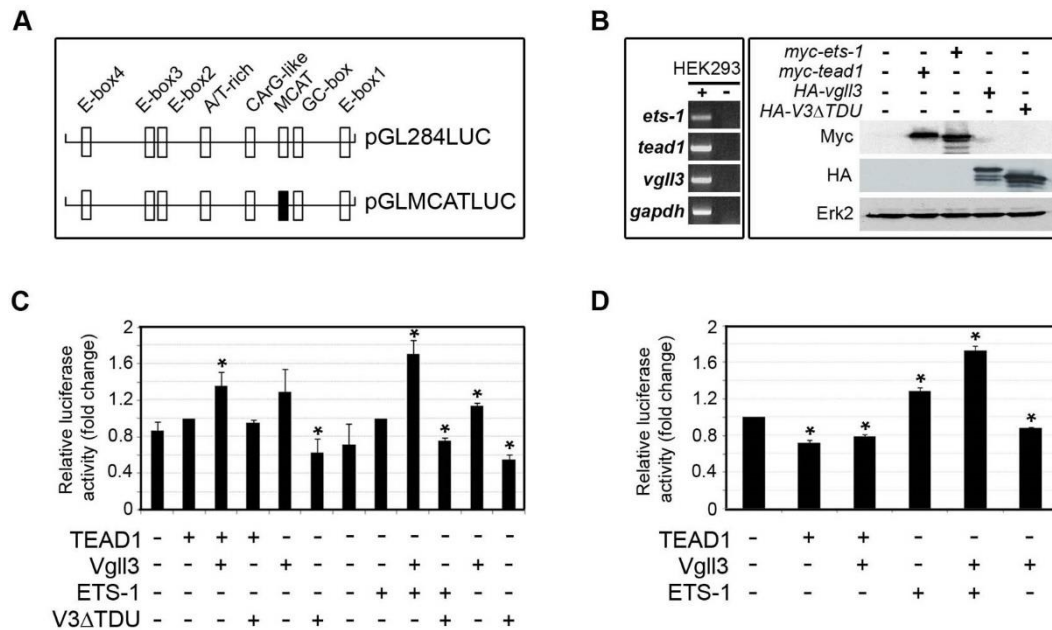


FIGURE 9

Vgl3 interacts with ets1 in cultured cells and activates a tead-dependent luciferase reporter gene.

(A) Schematic representation of the pGL284LUC and pGLMCATLUC reporter plasmids used in the experiments. The different *cis*-sequences present are depicted. The mutated MCAT *cis*-sequence is represented by a black box. (B) Left panel, RT-PCR analysis of untransfected HEK293 cells to check for the expression of endogenous *ets1*, *tead1* and *vgl3* mRNAs. *Gapdh* is used as an internal control. RT-PCR control without reverse transcription step. Right panel, western blot analysis of HEK293 cells transfected with 500 pg of *HA-vgl3*, *HA-V3ΔTDU*, *myc-tead1* or *myc-ets1* plasmids. Immunoblotting was performed using antibodies against Myc and HA. (C) Luciferase activity in HEK293 cells transfected with pGL284LUC plasmid with *HA-vgl3*, *HA-V3ΔTDU*, *myc-tead1* and *myc-ets1* as indicated. Luciferase activity was measured and normalized to internal Renilla control. Bars show mean \pm SEM of three independent experiments carried out in duplicate. Y-axis describes x-fold luciferase activity compared to *tead1* alone or *ets1* alone. (D) Luciferase activity in HEK293 cells transfected with pGLMCATLUC plasmid with *HA-vgl3* and *myc-tead1* as indicated. Luciferase activity was measured and normalized to internal Renilla control. Bars show mean \pm SEM of three independent experiments carried out in duplicate. Y-axis describes x-fold luciferase activity compared to pGLMCATLUC/Renilla alone. * $p < 0.05$ by t-test.

their proper delamination in early chick embryogenesis (Tahtakran and Selleck, 2003; Theveneau et al., 2007). In *Xenopus*, *ets1* is expressed in neural tube, neural crest cells and their derivatives (Meyer et al., 1997). It has been showed that *ets1* is an immediate-early target gene of *pax3* (Plouhinec et al., 2014). Therefore, we examined the effect of *ets1* overexpression on *pax3* expression in *Xenopus*. Embryos were injected with 1ng of *ets1* mRNA into one blastomere at two-cell stage embryos and embryos allowed to develop until stage 11, then fixed. and analysed for *pax3* expression by *in situ* hybridization. Embryos that overexpress *ets1* showed an ectopic expression of *pax3* on the injected when compared to uninjected side (Fig. 8C). Similar results were obtained when *vgl3* was co-expressed with *ets1* (Fig. 8C). We next tested the hypothesis that *vgl3* could interact with *ets1* in the embryo. Embryos co-injected with *HA-Vgl3* mRNA and *myc-ets1* mRNA were allowed to develop until blastula stage and proceed for immunoprecipitation and western blot as before. As demonstrated by the results, *vgl3* and *ets1* can interact in the embryo (Fig. 8D). However, despite their interaction, *vgl3* and *ets1* did not seem to synergize to stimulate *pax3* expression (Fig. 7C). To address the functionality of *vgl3/ets1* complex, we used a gene reporter analysis. We have previously shown that a 284pb sequence of the *α -tropomyosin* gene contained a MCAT binding site and could recapitulate endogenous gene expression pattern in a *tead1* dependent way (Fig. 8A) (Pasquet et al., 2006). Human kidney cells (HEK293) were cotransfected with various plasmids combinations encoding HA-*vgl3*, *myc-ets1* or *myc-tead1* and the pGL-284LUC reporter gene. HEK293 cells express *ets1*, *vgl3* and *tead1* as controlled by RT-PCR analysis (Fig. 9B). The expression level of each protein in transfected cells was assessed by western blot analysis (Fig. 9B). Transfected cells were culture for 24 h then lysed and tested for luciferase activity. Cells that overexpress *tead1* showed a basal luciferase activity that is stimulated 1.35 fold upon co-expression of *vgl3* (Fig. 9C). Cells that overexpress *ets1* have a basal luciferase activity that is stimulated 1.7 fold upon *vgl3* overexpression. This bias might reflect a preferential activation of the reporter gene in favor of *vgl3/ets1* than *vgl3/tead*. TEAD1 is shown to physically and functionally interact with vestigial proteins though a conserved domain called tondu (TDU) (Vaudin et al., 1999). Cells that co-express *ets1* and a *vgl3* protein deleted from its TDU domain (*Vgl3 Δ TDU*) showed a luciferase activity that is significantly reduced compared to wild type *vgl3* protein (Fig. 9C). To determine if the promotor activation is due to the presence of the MCAT sequence, we performed the same experiments using a luciferase reporter gene containing a mutated MCAT sequence (pGLMCATLUC) (Pasquet et al., 2006). This mutation

inhibits the stimulation by *vgll3/tead1* but has no effect on *vgll3/ets1* stimulation suggesting that MCAT binding site is not the only site for *ets1* binding (Fig. 9D).

DISCUSSION

In the present study, we have addressed the function of vestigial-like 3 (*vgll3*) during early development in the *Xenopus* model. *Vgll3* is member of the vestigial protein family whose components have all in common a highly conserved domain (Tondu) that mediates their interaction with TEAD transcription factors (Scalloped in *Drosophila*) (Simon et al., 2015 for review). In *Drosophila*, Vestigial functions as a transactivator and the protein complex Vestigial/Scalloped binds to DNA in a sequence specific manner, thus activating specific genes within the regulatory network that control wing development (Halder et al., 1998; Williams et al., 1991). Because of their interaction with TEADs, vestigial-like proteins undoubtedly have a profound effect on numerous functions, with a potential action at nodal points in several cellular processes mediated by TEADs (Pobbati et al., 2012). Despite the wealth of data accumulated on Vestigial in *Drosophila*, the functions of its vertebrate's ortholog is still largely unknown. Four vestigial like genes (*Vgll1-4*) have been described in vertebrates and they fall into two subfamilies depending on the number of Tondu domain they have (Simon et al., 2015). The first subfamily comprises *Vgll1-3* proteins that have a single Tondu domain of 24 amino-acids, while *Vgll4* constitute a second subfamily that comprises proteins with two Tondu domains of 10 amino-acids each (Simon et al., 2015). We have described in the *Xenopus* amphibian four *vgll4* genes, *vgll1-4*, that are true ortholog of *Vgll* mammalian genes (Faucheux et al., 2010). A fifth *vestigial* gene, *vgll4l*, has been recently described that is specific to amphibian and fishes lineages (Barrionuevo et al., 2014). Each of the *Vgll* gene has a unique expression pattern during *Xenopus* early development and we found that *vgll3* expression in early embryo is restricted to rhombomere 2 (r2) of the hindbrain (Faucheux et al., 2010). We showed here that *vgll3* expression is spatially restricted in the hindbrain through a combination of multiple signals including retinoic acid (RA), FGF8, *hoxa2* and *hoxb2*. *Vgll3* is expressed at low dose of RA and embryo treated with increased amount showed a total extinction of the gene. Overexpression of FGF8 causes an expansion of *vgll3* expression domain laterally towards ventral region of the embryo and slightly in rostral direction although this expression is limited by the midbrain-hindbrain border boundary organizer. This is consistent with previous findings that showed that FGF8 restrict the caudal boundary of anterior neural gene and our observation where *engrailed2* overexpression switched off *vgll3* (Faucheux et al., 2010; Fletcher et al.,

2006). The expression of *vgl3* is caudally restricted by *hoxb2* and *hoxb2* overexpression completely turns off *vgl3* expression. Surprisingly, *hoxa2* overexpression also switches off *vgl3* expression suggesting that in the normal developing embryo, *vgl3* is not subject to this repression or is counteracted by positive signals. *Hoxa2* is the only *hox* gene expressed in r2 and its expression extends to r1/r2 in mouse and *Xenopus* embryos (Alexander et al., 2009; Baltzinger et al., 2005; Pasqualetti et al., 2000). Surprisingly, gain and loss of function of *hoxa2* in *Xenopus* embryo phenocopies our results on *vgl3* gain and loss of function. In both cases, embryos displayed cranial skeletal and muscles head defects and neural cell crest segregation and migration (Baltzinger et al., 2005; Pasqualetti et al., 2000). This fits with the hypothesis that *hoxa2* could be a repressor of *vgl3* in r2. Therefore down regulation of *hoxa2* induces increased *vgl3* expression thus phenocopying *vgl3* gain of function while overexpression of *hoxa2* blocks *vgl3* expression phenocopying *vgl3* depletion. The *hoxa2* repression effect on *vgl3* might be counteracted by FGF8 for instance or other activators that needs to be find. Together, the restricted *vgl3* expression in r2 results from several positive and negative signaling inputs and makes the gene a powerful tool to investigate the complex molecular networks that pattern the most part of the hindbrain.

***Vgl3* regulates neurogenesis and is necessary for trigeminal formation**

Rhombomere segmentation of the hindbrain governs the formation and organization of nerve nuclei and rhombomere 2 is the source of neurons that will form the trigeminal nerve (Lumsden and Keynes, 1989). Neurons from the trigeminal ganglion is a mix of neural crest cells and neurons derived from trigeminal maxillomandibular (mmV) and ophthalmic trigeminal placodes (opV) (Schlosser and Northcutt, 2000). We show here that gain and loss of function of *vgl3* clearly affected neuronal differentiation and with a reduced *N-tubulin* expression in trigeminal placodes in stage 19 embryo. The effect is more pronounced at later stage where *vgl3* depleted embryos show a reduction in ophtalmic branch of the trigeminal nerve and in axonal outgrowth. This is not related to an increased apoptosis but very certainly to the differentiation step as the expression of the proneural *sox2* gene expression is not affected in those experiments (data not shown). Two lines of evidence suggest that *vgl3* could regulate trigeminal placode development through *pax3*, a gene associated with placode development (Schlosser and Ahrens, 2004). Firstly, *vgl3* depleted embryo show a down regulation of *pax3* at the level of trigeminal placode and *vgl3* overexpression induces a strong *pax3* ectopic expression in the embryo. Secondly, the overexpression of *vgl3* and *tead2* in pluripotent animal cap cells strongly stimulates *pax3* expression. The findings that similar phenotypes are observed

in gain- and loss -of- function studies of *vgll3* may be conceivable if we consider a functional dependence on protein-protein interaction where proper stoichiometry is essential. In our case this could be related to the formation of the complex with tead proteins that are the major partners of vestigial proteins.

***Vgll3* is implicated in signaling pathways that control formation and migration of cranial neural crest cells**

We showed that *vgll3* overexpression induces ectopic *pax3* expression both in animal cap cells and in the embryo. *Vgll3* is also required for the expansion of *pax3* expressing neural crest progenitors at the neural plate border. Due to its highly restricted spatial expression, the effects of *vgll3* depletion on *pax3* expression is very subtle in early stage but more obvious at later stage once CNC have migrate. However, stage 19 *vgll3*-depleted embryos or that overexpress *vgll3* show a defect in the segregation of CNC in three distinct premigratory blocks and a dramatic decrease in their migration to form branchial arches. Although *vgll3* expression is excluded from *snail2* expression area, *pax3* overlaps with *snail2* and *krox20* from stages 13 to 20 (Monsoro-Burq et al., 2005). In the meantime, we demonstrated that *vgll3* and *krox20* expression is overlapping in the hindbrain of stage 13 embryo, before segmentation into r2 and r3/r5 respectively. In this case, *vgll3* overlaps with *pax3* expression domain and this support the hypothesis of a direct effect of *vgll3* on *pax 3* expression.

The proper development of branchial arches requires adhesive interactions of CNC cells with each other and an extracellular substrate. During their migration, cells maximize their adhesions by spreading on the matrix and any interference with their adhesive properties entails migration defects. The unconventional *myosinX* has been shown, among numerous other factors, to be required for adhesion of CNC cells and to the extracellular matrix (Nie et al., 2009). CNC from *vgll3*-depleted embryo attached but fail to spread on fibronectin substrates, instead remaining rounded as it has been described for *myosinX* knockdown (Nie et al., 2009). Consistent with this finding, *vgll3* knockdown in embryo and in animal caps cells decreases the expression of *myosinX*, which may explain the inhibition of CNC cell migration *in vivo*. As suggested for mammalian cells, *vgll3*-dependent down regulation of *myosinX* could translocate $\beta 1$ -integrin to the tips of filopodia to regulate CNC cell-matrix interaction (Nie et al., 2009; Zhang et al., 2004). Moreover, *myosinX* knock down results in intermingling of CNC cells between different branchial arch streams and abnormal migration patterns a phenotype very similar to the *in vivo* *vgll3* knock down we have described (Nie et al., 2009). In mouse embryo,

myosinX has been found to be implicated in neurite outgrowth (Zhu et al., 2007) thus establishing a link between *vgll3* and a myosinX-dependent trigeminal nerve formation in *Xenopus* embryo.

After induction at the border of the neural plate, CNC cells leave their original territory through a delamination process followed by an intense migration step. CNC migrate collectively and it has been found that cadherin-mediated cell-cell interaction play a crucial role in both delamination and migration (Theveneau and Mayor, 2012). CNC express several kind of cadherins which are regulated by a complex network of transcription factors including several proto-oncogenes (Theveneau and Mayor, 2012).. We have found that down regulation of *vgll3* induced a down regulation of *N-cadherin* and *pcdh18* expression in animal cap explants and a decrease in the expression of the protocadherin *PCNS* and *pcdh18* in the embryo. These results are consistent with a role of *vgll3* in the activation of the corresponding genes in order maintain cell to cell interaction and proper migration of CNC. *Vgll3*-depleted embryos showed a disorganization of hatching gland development as it has been observed in zebrafish where *pcdh18* expression has been knockdown (Aamar and Dawid, 2008). Our results emphasize the role of *vgll3* in the genetic regulatory network that control cell to cell interactions and cell to matrix attachment that could explain its essential function in CNC migration. This is the first time that a vestigial-like family member is shown to be part of the gene regulatory network of transcription factors that orchestrate both neural crest formation and migration.

***Vgll3* is essential for craniofacial development**

Craniofacial development comprising cartilage and muscle formation is directly related to neural crest cell formation and migration. We showed that gain-or loss-of- function of *vgll3* impaired normal cartilage development inducing a tissue hypoplasia. We may hypothesize that this results from an impairment of CNC migration confirming above findings. It is known that *twist* is required for both mesoderm formation, neural crest formation and migration and *twist1* haploinsufficiency leads to skeletal dysplasia migration (Lander et al., 2013; Miraoui and Marie, 2010; Soo et al., 2002). *Vgll3*-depleted embryo phenocopied *twist* depleted embryos (Lander et al., 2013). Because *twist* is expressed much later than *vgll3* in the developing embryo we may hypothesize that it can be a target of *vgll3* but this need to be tested. Head muscle development is also impaired in *vgll3*- depleted embryos, consistent with the necessary interaction of migrating CNC with mesodermal cells in order to form normal cranial structures (Grenier et al., 2009). Surprisingly, a potential involvement of *vgll3* in neural crest cells

emerged from the report on a human patient that presents a microdeletion of chromosomal region 3p11.2-p12.1 that includes *VGLL3* gene (Gat-Yablonski et al., 2011). The patient presented a dysmorphic development with frontal bossing, saddle nose and small chin, all of these features could be the result of alteration in the formation and migration of neural crest cells. Curiously, *VGLL3* gene has also been found to be significantly higher in adult cartilage in human presenting endemic osteoarthritis suggesting its implication in cartilage development (Wang et al., 2009).

Ets1 is a new partner of *vgll3*

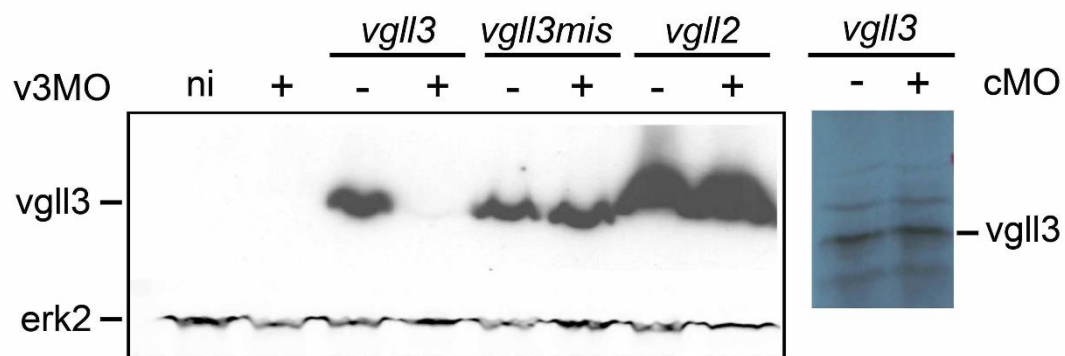
We showed that *vgll3* can interact in the embryo with tead1 or tead2. This is consistent with what is known about vestigial protein as a cofactor of tead proteins. However, we have found that the complex *vgll3*/tead1, unlike the complex *vgll3*/tead2, is able to induce *pax3* expression in animal cap cells. This is also true for *zic1*, *snail2* or *N-cadherin* but not for *myosinX*. This suggests that the complexes *vgll3*/tead1 and *vgll3*/tead2 have distinct cis-regulatory targets or that animal cap cells are missing a factor, present in the embryo that is required for *pax3* induction by *vgll3*/tead2. Alternatively, this might be reminiscent to what has been observed in *Drosophila* where the binding of Vestigial to Scalloped can switch the DNA-binding selectivity of Scalloped (Halder and Carroll, 2001). Two lines of evidence suggest that tead1 is not the only transcription factor that conveys *vgll3* activity *in vivo*. Firstly, tead1 overexpression induces *pax3* in the embryo but not as strong as what is observed in *vgll3* overexpression assay ((Gee et al., 2011) and Data not shown). Secondly, *vgll3* overexpression in tead1/2 depleted embryo still strongly activates ectopic expression of *pax3*. Surprisingly, the core domain 5-GGAA-3' of tead binding site perfectly matches for the cis-sequence recognized by the protein ets1 that is expressed in cranial CNC and has been found to be required for cell delamination (Meyer et al., 1997; Theveneau et al., 2007; Theveneau and Mayor, 2012). We have demonstrated that *vgll3* can bind to ets1 protein in the embryo and when co expressed with ets1 can stimulate a MCAT-luciferase gene reporter. Therefore we may imagine that *vgll3* can either bind to tead or ets1 in the embryo depending on cell context but also the relative affinity of partners. However, the cis-regulatory site for tead being twice much longer than those of ets1 (8 bp for tead vs 4 bp) this implies that the repertoire of target genes is greater for *vgll3*/ets1 than for *vgll3*/tead1. In the future, it will be interesting to determine the relative affinity of *vgll3* for tead and ets1 and the repertoire of target genes for the two complexes. Surprisingly, several reports have pointed out conflicting results about a potential role of human

VGLL3 in regulation of tumorigenesis. For some of them VGLL3 could play a role in tumor suppression pathway while others point out a role as tumor suppressor (Antonescu et al., 2011; Cody et al., 2007; Cody et al., 2009; Gambaro et al., 2013; Hallor et al., 2009; Helias-Rodzewicz et al., 2010). Those conflicting results may reflect different complexes formation VGLL3/TEAD or VGLL3/ETS1 depending on the cellular context and with distinct gene targets.

In summary, this study addressed the question of the function of *vgll3* in early development. Our results provide evidence that *vgll3* has a dual role in trigeminal nerve formation and in cranial neural crest formation and migration during early development. We found that *vgll3* activate *pax3* and *zic1* therefore being part of the gene regulatory network that orchestrate neural crest formation. Moreover, we found that *ets1* is a novel partner so far not characterized of *vgll3*. This unexpected result is especially challenging as *ets1* is not only a key player in delamination and migration of neural crest cell but also a proto-oncogene. This suggests that *vgll3* can regulate distinct gene targets and activate or repress signaling pathways depending on its association with different transcription factors. This should be helpful in our exploration of its function in mammalian cells.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been supported by the University of Bordeaux and the CNRS. We thank Dr Monsoro-Burck and Dr Millet for *Pax3/Pax3GR* and *Zic1/Zic1GR* constructions and for technical support.



SUPPLEMENTARY Fig. S1

Specificity of vgl3 MO (v3MO).

Specificity of vgl3 MO (v3MO). Western blot is performed using protein extracted from one stage 15 embryo after injection of v3MO with mRNAs as noted (0.5 ng each). Vgl3, vgl3mismatch or vgl2 are detected using tagged protein (HA tag). v3MO (40 ng) blocks the translation of *vgl3* mRNA in the embryo. It has no effect on the translation of *vgl3* mismatch mRNA (*vgl3mis*) where MO sequence recognition is absent and of *vgl2* mRNA. Erk2 is used for loading controls. On the right panel, the specificity of the control MO (cMO) is proved in *vgl3* mRNA translation *in vitro* using methionine ³⁵S.

REFERENCES

- Aamar, E., Dawid, I.B., 2008. Protocadherin-18a has a role in cell adhesion, behavior and migration in zebrafish development. *Developmental biology* 318, 335-346.
- Alexander, T., Nolte, C., Krumlauf, R., 2009. Hox genes and segmentation of the hindbrain and axial skeleton. *Annual review of cell and developmental biology* 25, 431-456.
- Alfandari, D., Cousin, H., Gaultier, A., Hoffstrom, B.G., DeSimone, D.W., 2003. Integrin alpha5beta1 supports the migration of *Xenopus* cranial neural crest on fibronectin. *Developmental biology* 260, 449-464.
- Antonescu, C.R., Zhang, L., Nielsen, G.P., Rosenberg, A.E., Dal Cin, P., Fletcher, C.D., 2011. Consistent t(1;10) with rearrangements of TGFBR3 and MGEA5 in both myxoinflammatory fibroblastic sarcoma and hemosiderotic fibrolipomatous tumor. *Genes, chromosomes & cancer* 50, 757-764.
- Baltzinger, M., Ori, M., Pasqualetti, M., Nardi, I., Rijli, F.M., 2005. Hoxa2 knockdown in *Xenopus* results in hyoid to mandibular homeosis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 234, 858-867.
- Barrionuevo, M.G., Aybar, M.J., Tribulo, C., 2014. Two different vestigial like 4 genes are differentially expressed during *Xenopus laevis* development. *The International journal of developmental biology* 58, 369-377.
- Betancur, P., Bronner-Fraser, M., Sauka-Spengler, T., 2010. Assembling neural crest regulatory circuits into a gene regulatory network. *Annual review of cell and developmental biology* 26, 581-603.
- Chambers, D., Wilson, L.J., Alfonsi, F., Hunter, E., Saxena, U., Blanc, E., Lumsden, A., 2009. Rhombomere-specific analysis reveals the repertoire of genetic cues expressed across the developing hindbrain. *Neural Dev* 4, 6.
- Chang, C., Hemmati-Brivanlou, A., 1998. Neural crest induction by Xwnt7B in *Xenopus*. *Developmental biology* 194, 129-134.
- Chen, H.H., Maeda, T., Mullett, S.J., Stewart, A.F., 2004a. Transcription cofactor Vgl-2 is required for skeletal muscle differentiation. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* 39, 273-279.
- Chen, H.H., Mullett, S.J., Stewart, A.F., 2004b. Vgl-4, a novel member of the vestigial-like family of transcription cofactors, regulates alpha1-adrenergic activation of gene expression in cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* 279, 30800-30806.
- Cody, N.A., Ouellet, V., Manderson, E.N., Quinn, M.C., Filali-Mouhim, A., Tellis, P., Zietarska, M., Provencher, D.M., Mes-Masson, A.M., Chevrette, M., Tonin, P.N., 2007. Transfer of chromosome 3 fragments suppresses tumorigenicity of an ovarian cancer cell line monoallelic for chromosome 3p. *Oncogene* 26, 618-632.
- Cody, N.A., Shen, Z., Ripeau, J.S., Provencher, D.M., Mes-Masson, A.M., Chevrette, M., Tonin, P.N., 2009. Characterization of the 3p12.3-pcen region associated with tumor suppression in a novel ovarian cancer cell line model genetically modified by chromosome 3 fragment transfer. *Molecular carcinogenesis* 48, 1077-1092.
- Delaune, E., Lemaire, P., Kodjabachian, L., 2005. Neural induction in *Xenopus* requires early FGF signalling in addition to BMP inhibition. *Development (Cambridge, England)* 132, 299-310.
- Faucheux, C., Naye, F., Treguer, K., Fedou, S., Thiebaud, P., Theze, N., 2010. Vestigial like gene family expression in *Xenopus*: common and divergent features with other vertebrates. *The International journal of developmental biology* 54, 1375-1382.
- Fletcher, R.B., Baker, J.C., Harland, R.M., 2006. FGF8 spliceforms mediate early mesoderm and posterior neural tissue formation in *Xenopus*. *Development (Cambridge, England)* 133, 1703-1714.
- Gambara, K., Quinn, M.C., Wojnarowicz, P.M., Arcand, S.L., de Ladurantaye, M., Barres, V., Ripeau, J.S., Killary, A.M., Davis, E.C., Lavoie, J., Provencher, D.M., Mes-Masson, A.M., Chevrette, M., Tonin, P.N., 2013. VGLL3 expression is associated with a tumor suppressor phenotype in epithelial ovarian cancer. *Molecular oncology* 7, 513-530.

- Gat-Yablonski, G., Frumkin-Ben David, R., Bar, M., Potievsky, O., Phillip, M., Lazar, L., 2011. Homozygous microdeletion of the POU1F1, CHMP2B, and VGLL3 genes in chromosome 3--a novel syndrome. *American journal of medical genetics. Part A* 155a, 2242-2246.
- Gee, S.T., Milgram, S.L., Kramer, K.L., Conlon, F.L., Moody, S.A., 2011. Yes-associated protein 65 (YAP1) expands neural progenitors and regulates Pax3 expression in the neural plate border zone. *PloS one* 6, e20309.
- Grenier, J., Teillet, M.A., Grifone, R., Kelly, R.G., Duprez, D., 2009. Relationship between neural crest cells and cranial mesoderm during head muscle development. *PloS one* 4, e4381.
- Halder, G., Carroll, S.B., 2001. Binding of the Vestigial co-factor switches the DNA-target selectivity of the Scalloped selector protein. *Development (Cambridge, England)* 128, 3295-3305.
- Halder, G., Polaczyk, P., Kraus, M.E., Hudson, A., Kim, J., Laughon, A., Carroll, S., 1998. The Vestigial and Scalloped proteins act together to directly regulate wing-specific gene expression in *Drosophila*. *Genes & development* 12, 3900-3909.
- Hallor, K.H., Sciot, R., Staaf, J., Heidenblad, M., Rydholm, A., Bauer, H.C., Astrom, K., Domanski, H.A., Meis, J.M., Kindblom, L.G., Panagopoulos, I., Mandahl, N., Mertens, F., 2009. Two genetic pathways, t(1;10) and amplification of 3p11-12, in myxoinflammatory fibroblastic sarcoma, haemosiderotic fibrolipomatous tumour, and morphologically similar lesions. *The Journal of pathology* 217, 716-727.
- Halloran, M.C., Berndt, J.D., 2003. Current progress in neural crest cell motility and migration and future prospects for the zebrafish model system. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 228, 497-513.
- Harland, R.M., 1991. In situ hybridization: an improved whole-mount method for *Xenopus* embryos. *Methods Cell Biol* 36, 685-695.
- Helias-Rodzewicz, Z., Perot, G., Chibon, F., Ferreira, C., Lagarde, P., Terrier, P., Coindre, J.M., Aurias, A., 2010. YAP11 and VGLL3, encoding two cofactors of TEAD transcription factors, are amplified and overexpressed in a subset of soft tissue sarcomas. *Genes, chromosomes & cancer* 49, 1161-1171.
- Hensey, C., Gautier, J., 1997. A developmental timer that regulates apoptosis at the onset of gastrulation. *Mechanisms of development* 69, 183-195.
- Hong, C.S., Saint-Jeannet, J.P., 2007. The activity of Pax3 and Zic1 regulates three distinct cell fates at the neural plate border. *Molecular biology of the cell* 18, 2192-2202.
- Knight, R.D., Nair, S., Nelson, S.S., Afshar, A., Javidan, Y., Geisler, R., Rauch, G.J., Schilling, T.F., 2003. lockjaw encodes a zebrafish tfap2a required for early neural crest development. *Development (Cambridge, England)* 130, 5755-5768.
- Krumlauf, R., 1994. Hox genes in vertebrate development. *Cell* 78, 191-201.
- LaBonne, C., Bronner-Fraser, M., 1998. Induction and patterning of the neural crest, a stem cell-like precursor population. *J Neurobiol* 36, 175-189.
- Lamb, T.M., Harland, R.M., 1995. Fibroblast growth factor is a direct neural inducer, which combined with noggin generates anterior-posterior neural pattern. *Development (Cambridge, England)* 121, 3627-3636.
- Lander, R., Nasr, T., Ochoa, S.D., Nordin, K., Prasad, M.S., Labonne, C., 2013. Interactions between Twist and other core epithelial-mesenchymal transition factors are controlled by GSK3-mediated phosphorylation. *Nat Commun* 4, 1542.
- Litsiou, A., Hanson, S., Streit, A., 2005. A balance of FGF, BMP and WNT signalling positions the future placode territory in the head. *Development (Cambridge, England)* 132, 4051-4062.
- Lumsden, A., Keynes, R., 1989. Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain. *Nature* 337, 424-428.
- Lumsden, A., Sprawson, N., Graham, A., 1991. Segmental origin and migration of neural crest cells in the hindbrain region of the chick embryo. *Development (Cambridge, England)* 113, 1281-1291.

- Maeda, T., Chapman, D.L., Stewart, A.F., 2002. Mammalian vestigial-like 2, a cofactor of TEF-1 and MEF2 transcription factors that promotes skeletal muscle differentiation. *The Journal of biological chemistry* 277, 48889-48898.
- Mayor, R., Morgan, R., Sargent, M.G., 1995. Induction of the prospective neural crest of *Xenopus*. *Development (Cambridge, England)* 121, 767-777.
- Meulemans, D., Bronner-Fraser, M., 2004. Gene-regulatory interactions in neural crest evolution and development. *Developmental cell* 7, 291-299.
- Meyer, D., Durliat, M., Senan, F., Wolff, M., Andre, M., Houdry, J., Remy, P., 1997. Ets-1 and Ets-2 proto-oncogenes exhibit differential and restricted expression patterns during *Xenopus laevis* oogenesis and embryogenesis. *The International journal of developmental biology* 41, 607-620.
- Mielcarek, M., Gunther, S., Kruger, M., Braun, T., 2002. VITO-1, a novel vestigial related protein is predominantly expressed in the skeletal muscle lineage. *Gene expression patterns : GEP* 2, 305-310.
- Mielcarek, M., Piotrowska, I., Schneider, A., Gunther, S., Braun, T., 2009. VITO-2, a new SID domain protein, is expressed in the myogenic lineage during early mouse embryonic development. *Gene expression patterns : GEP* 9, 129-137.
- Milewski, R.C., Chi, N.C., Li, J., Brown, C., Lu, M.M., Epstein, J.A., 2004. Identification of minimal enhancer elements sufficient for Pax3 expression in neural crest and implication of Tead2 as a regulator of Pax3. *Development (Cambridge, England)* 131, 829-837.
- Miraoui, H., Marie, P.J., 2010. Pivotal role of Twist in skeletal biology and pathology. *Gene* 468, 1-7.
- Moens, C.B., Prince, V.E., 2002. Constructing the hindbrain: insights from the zebrafish. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 224, 1-17.
- Monsoro-Burq, A.H., Fletcher, R.B., Harland, R.M., 2003. Neural crest induction by paraxial mesoderm in *Xenopus* embryos requires FGF signals. *Development (Cambridge, England)* 130, 3111-3124.
- Monsoro-Burq, A.H., Wang, E., Harland, R., 2005. Msx1 and Pax3 cooperate to mediate FGF8 and WNT signals during *Xenopus* neural crest induction. *Developmental cell* 8, 167-178.
- Naye, F., Treguer, K., Soulet, F., Faucheux, C., Fedou, S., Theze, N., Thiebaud, P., 2007. Differential expression of two TEF-1 (TEAD) genes during *Xenopus laevis* development and in response to inducing factors. *The International journal of developmental biology* 51, 745-752.
- Nie, S., Kee, Y., Bronner-Fraser, M., 2009. Myosin-X is critical for migratory ability of *Xenopus* cranial neural crest cells. *Developmental biology* 335, 132-142.
- Nieuwkoop, P.D., Faber, J., 1975. Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin), in: Co, E.N.-H.P. (Ed.), 2nd ed. Garland, Amsterdam.
- Noden, D.M., 1991. Vertebrate craniofacial development: the relation between ontogenetic process and morphological outcome. *Brain Behav Evol* 38, 190-225.
- Noden, D.M., Francis-West, P., 2006. The differentiation and morphogenesis of craniofacial muscles. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 235, 1194-1218.
- Noden, D.M., Trainor, P.A., 2005. Relations and interactions between cranial mesoderm and neural crest populations. *J Anat* 207, 575-601.
- Nonchev, S., Vesque, C., Maconochie, M., Seitanidou, T., Ariza-McNaughton, L., Frain, M., Marshall, H., Sham, M.H., Krumlauf, R., Charnay, P., 1996. Segmental expression of Hoxa-2 in the hindbrain is directly regulated by Krox-20. *Development (Cambridge, England)* 122, 543-554.
- Papalopulu, N., Clarke, J.D., Bradley, L., Wilkinson, D., Krumlauf, R., Holder, N., 1991. Retinoic acid causes abnormal development and segmental patterning of the anterior hindbrain in *Xenopus* embryos. *Development (Cambridge, England)* 113, 1145-1158.

- Pasqualetti, M., Ori, M., Nardi, I., Rijli, F.M., 2000. Ectopic *Hoxa2* induction after neural crest migration results in homeosis of jaw elements in *Xenopus*. *Development* (Cambridge, England) 127, 5367-5378.
- Pasquet, S., Naye, F., Faucheux, C., Bronchain, O., Chesneau, A., Thiebaud, P., Theze, N., 2006. Transcription enhancer factor-1-dependent expression of the α -tropomyosin gene in the three muscle cell types. *The Journal of biological chemistry* 281, 34406-34420.
- Plouhinec, J.L., Roche, D.D., Pegoraro, C., Figueiredo, A.L., Maczkowiak, F., Brunet, L.J., Milet, C., Vert, J.P., Pollet, N., Harland, R.M., Monsoro-Burq, A.H., 2014. Pax3 and Zic1 trigger the early neural crest gene regulatory network by the direct activation of multiple key neural crest specifiers. *Developmental biology* 386, 461-472.
- Pobbati, A.V., Chan, S.W., Lee, I., Song, H., Hong, W., 2012. Structural and functional similarity between the Vgll1-TEAD and the YAP1-TEAD complexes. *Structure* (London, England : 1993) 20, 1135-1140.
- Rangarajan, J., Luo, T., Sargent, T.D., 2006. PCNS: a novel protocadherin required for cranial neural crest migration and somite morphogenesis in *Xenopus*. *Developmental biology* 295, 206-218.
- Schilling, T.F., Prince, V., Ingham, P.W., 2001. Plasticity in zebrafish *hox* expression in the hindbrain and cranial neural crest. *Developmental biology* 231, 201-216.
- Schlosser, G., Ahrens, K., 2004. Molecular anatomy of placode development in *Xenopus laevis*. *Developmental biology* 271, 439-466.
- Schlosser, G., Northcutt, R.G., 2000. Development of neurogenic placodes in *Xenopus laevis*. *The Journal of comparative neurology* 418, 121-146.
- Schneider-Maunoury, S., Topilko, P., Seitandou, T., Levi, G., Cohen-Tannoudji, M., Pournin, S., Babinet, C., Charnay, P., 1993. Disruption of *Krox-20* results in alteration of rhombomeres 3 and 5 in the developing hindbrain. *Cell* 75, 1199-1214.
- Sechrist, J., Serbedzija, G.N., Scherson, T., Fraser, S.E., Bronner-Fraser, M., 1993. Segmental migration of the hindbrain neural crest does not arise from its segmental generation. *Development* (Cambridge, England) 118, 691-703.
- Sementchenko, V.I., Watson, D.K., 2000. Ets target genes: past, present and future. *Oncogene* 19, 6533-6548.
- Serbedzija, G.N., Bronner-Fraser, M., Fraser, S.E., 1992. Vital dye analysis of cranial neural crest cell migration in the mouse embryo. *Development* (Cambridge, England) 116, 297-307.
- Sharrocks, A.D., 2001. The ETS-domain transcription factor family. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2, 827-837.
- Sive, H.L., Grainger, R.M., Harland, R.M., 2000. Early Development of *Xenopus laevis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Soo, K., O'Rourke, M.P., Khoo, P.L., Steiner, K.A., Wong, N., Behringer, R.R., Tam, P.P., 2002. Twist function is required for the morphogenesis of the cephalic neural tube and the differentiation of the cranial neural crest cells in the mouse embryo. *Developmental biology* 247, 251-270.
- Tahtakran, S.A., Selleck, M.A., 2003. Ets-1 expression is associated with cranial neural crest migration and vasculogenesis in the chick embryo. *Gene expression patterns : GEP* 3, 455-458.
- Tazumi, S., Yabe, S., Uchiyama, H., 2010. Paraxial T-box genes, *Tbx6* and *Tbx1*, are required for cranial chondrogenesis and myogenesis. *Developmental biology* 346, 170-180.
- Theveneau, E., Duband, J.L., Altabef, M., 2007. Ets-1 confers cranial features on neural crest delamination. *PloS one* 2, e1142.
- Theveneau, E., Mayor, R., 2012. Neural crest delamination and migration: from epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration. *Developmental biology* 366, 34-54.
- Treguer, K., Naye, F., Thiebaud, P., Fedou, S., Soulet, F., Theze, N., Faucheux, C., 2009. Smooth muscle cell differentiation from human bone marrow: variations in cell type

- specific markers and *Id* gene expression in a new model of cell culture. *Cell biology international* 33, 621-631.
- Vaudin, P., Delanoue, R., Davidson, I., Silber, J., Zider, A., 1999. TONDU (TDU), a novel human protein related to the product of vestigial (*vg*) gene of *Drosophila melanogaster* interacts with vertebrate TEF factors and substitutes for *Vg* function in wing formation. *Development (Cambridge, England)* 126, 4807-4816.
- Villanueva, S., Glavic, A., Ruiz, P., Mayor, R., 2002. Posteriorization by FGF, Wnt, and retinoic acid is required for neural crest induction. *Developmental biology* 241, 289-301.
- Wang, W.Z., Guo, X., Duan, C., Ma, W.J., Zhang, Y.G., Xu, P., Gao, Z.Q., Wang, Z.F., Yan, H., Zhang, Y.F., Yu, Y.X., Chen, J.C., Lammi, M.J., 2009. Comparative analysis of gene expression profiles between the normal human cartilage and the one with endemic osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 17, 83-90.
- Williams, J.A., Bell, J.B., Carroll, S.B., 1991. Control of *Drosophila* wing and haltere development by the nuclear vestigial gene product. *Genes & development* 5, 2481-2495.
- Zhang, H., Berg, J.S., Li, Z., Wang, Y., Lang, P., Sousa, A.D., Bhaskar, A., Cheney, R.E., Stromblad, S., 2004. Myosin-X provides a motor-based link between integrins and the cytoskeleton. *Nature cell biology* 6, 523-531.
- Zhu, X.J., Wang, C.Z., Dai, P.G., Xie, Y., Song, N.N., Liu, Y., Du, Q.S., Mei, L., Ding, Y.Q., Xiong, W.C., 2007. Myosin X regulates netrin receptors and functions in axonal path-finding. *Nature cell biology* 9, 184-192.

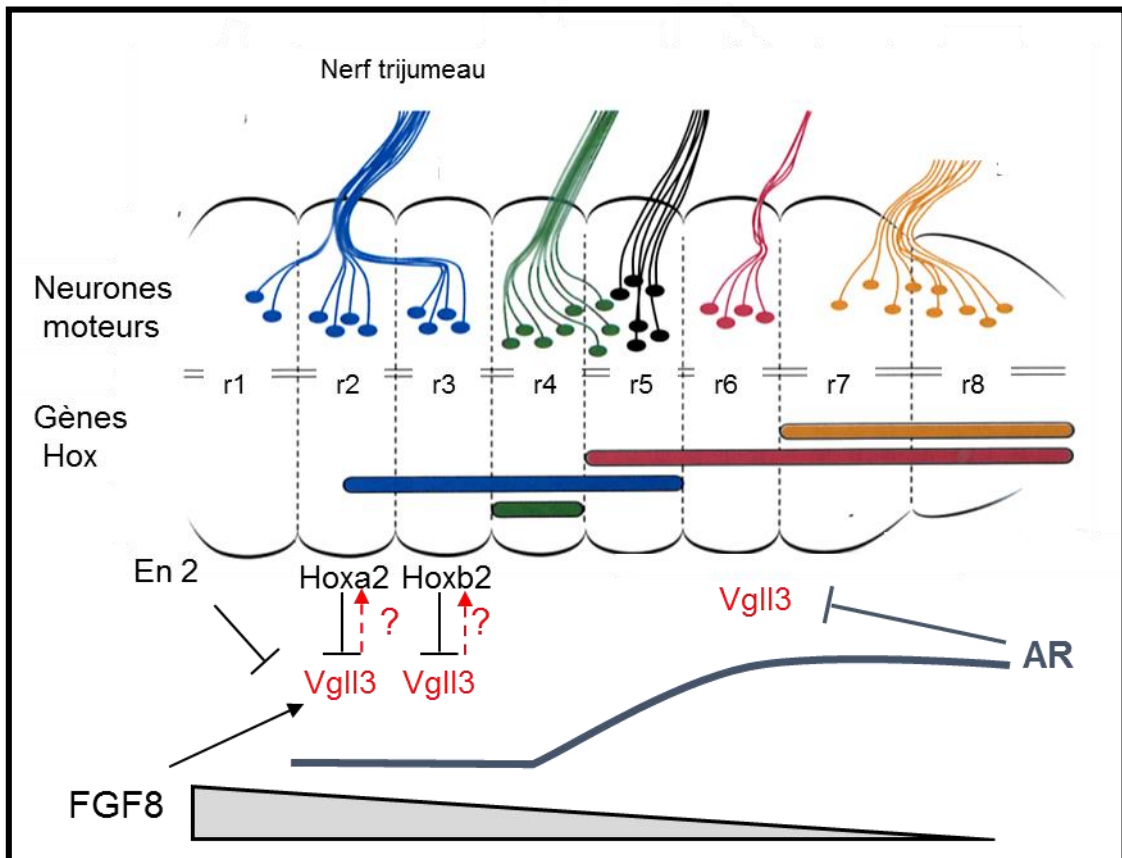


Figure 59 : L'expression de *vgl3* est restreinte au rhombomère 2.

Représentation schématique du cerveau postérieur divisé en rhombomères (d'après William A Harris). *Vgll3* est exprimé exclusivement dans le rhombomère 2. Son expression est régulée positivement par le FGF8 et négativement par les gènes *hoxa2* et *hoxb2* et par l'acide rétinoïque (AR).

Discussion

Vestigial-like 3 est un membre de la famille des protéines vestigiales qui ont pour caractéristique commune de posséder un domaine très conservé, appelé Tonus, leur permettant d'interagir avec les facteurs de transcription de la famille TEAD. Le complexe vestigial/TEAD active un ensemble de gènes cibles qui chez la drosophile contrôlent la formation de l'aile. Chez les vertébrés, il existe quatre gènes *Vestigial-like* dont la fonction est encore mal connue. Aucun travail à ce jour ne documente la fonction de *vgll3*. L'équipe a caractérisé les quatre gènes *vestigial-like* de xénope et montré que le gène *vgll3* est exprimé de manière très spécifique dans le rhombomère 2 du cerveau postérieur de l'embryon (Fauchoux et al., 2010). Nos travaux mettent en évidence une double fonction de *vgll3* dans l'embryon : il est nécessaire à la formation du nerf trijumeau et à la migration des cellules de la crête neurale. *Vgll3* interagit avec les deux protéines TEAD1 et TEAD2 que l'équipe a caractérisées chez xénope (Naye et al., 2007). Cependant cette interaction ne semble pas suffisante pour expliquer nos résultats expérimentaux et nous avons démontré que la protéine ETS1 était un nouveau partenaire de *vgll3* dans l'embryon.

Régulation de l'expression de *vgll3* dans le rhombomère 2

Les travaux antérieurs de l'équipe ont établi que l'expression de *vgll3* est restreinte aux niveaux spatial et temporel. Elle commence à partir du stade 12 de l'embryogenèse puis diminue au cours du développement. Dans l'embryon, elle est limitée au rhombomère 2 du cerveau postérieur. Il est acquis que la formation du cerveau postérieur est sous le contrôle de plusieurs régulateurs tels que les gènes *hox* dont l'expression coïncide avec les frontières des rhombomères. Les voies FGF, Wnt et l'acide rétinoïque sont également impliquées dans la mise en place du cerveau postérieur (Alexander et al., 2009; Kudoh et al., 2002). Nous avons observé que l'acide rétinoïque inhibait l'expression de *vgll3*. Ceci est en accord avec le caractère postérieurisant de l'acide rétinoïque (Papalopulu et al., 1991; Ruiz i Altaba and Jessell, 1991). La surexpression de FGF8 dans l'embryon stimule l'expression de *vgll3* de manière spatiale en étendant son domaine latéralement et de façon très limitée antérieurement. Ceci est cohérent avec le fait que FGF8 restreint caudalement le domaine d'expression des gènes antérieurs et d'autre part qu'*engrailed 2* (en 2) inhibe l'expression de *vgll3* (Fauchoux et al., 2010; Fletcher et al., 2006) (Figure 59).

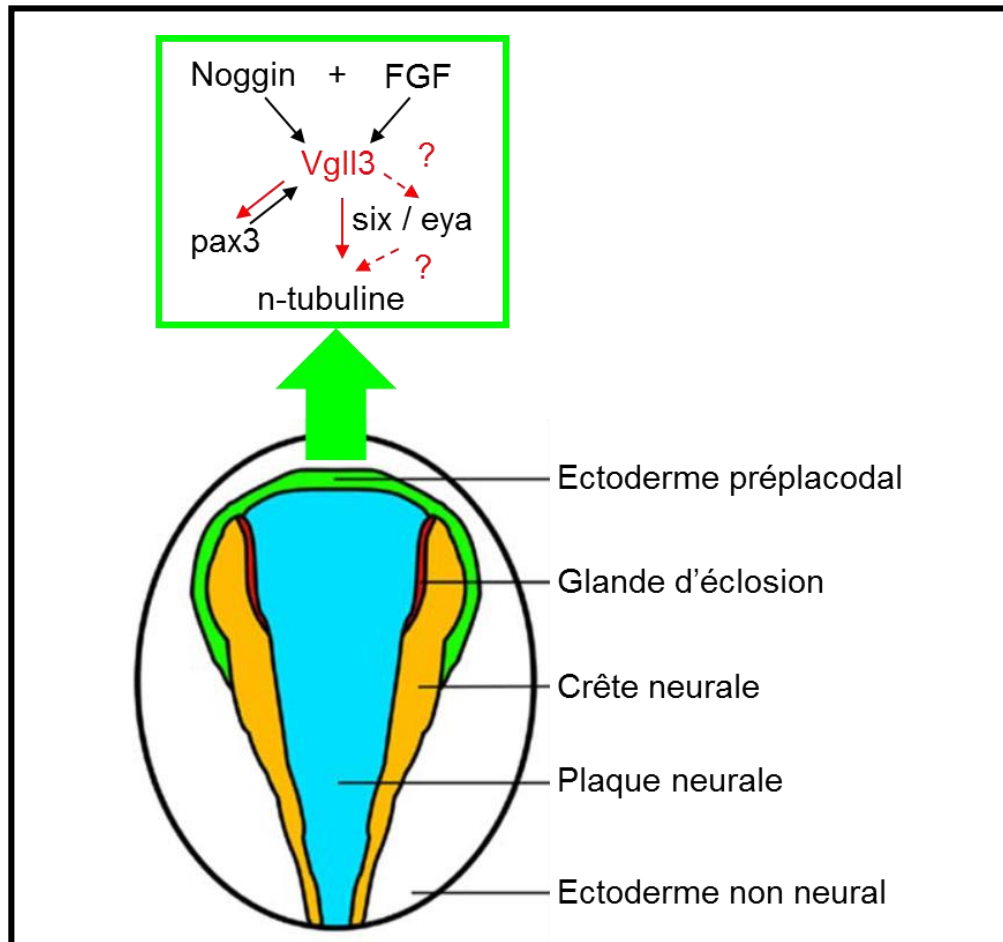


Figure 60 : Vgll3 est impliqué dans la formation de la placode trigéminale.

Représentation schématique d'un embryon au stade neurula précoce en vue dorsale (Hong and Saint-Jeannet, 2007). Vgll3 est régulé par Noggin et FGF ainsi que par pax3, et est impliqué dans la formation de la placode trigéminale et la formation du nerf trijumeau.

Nos travaux indiquent que la surexpression de *hoxb2* inhibe l'expression de *vgll3*. Or, la limite antérieure d'expression de *hoxb2* correspond à la frontière r2/r3 (Baltzinger et al., 2005; Pasqualetti et al., 2000). Ceci suggère que *hoxb2* pourrait être un régulateur négatif de *vgll3* dans l'embryon empêchant son expression postérieure à r2. La surexpression de *hoxa2* dans l'embryon inhibe également l'expression de *vgll3* dans le rhombomère 2. La limite antérieure d'expression de *hoxa2* correspond à la frontière r1/r2 chez la souris et le xénope (Alexander et al., 2009; Baltzinger et al., 2005; Pasqualetti et al., 2000). Nos résultats suggèrent que durant le développement normal de l'embryon *vgll3* n'est pas soumis à l'inhibition par *hoxa2* ou est contrecarré par des facteurs positifs comme le facteur FGF8 qui est fortement activateur de *vgll3*. De manière intéressante, le knock-down de *hoxa2* ou sa surexpression donne des phénotypes très similaires à ceux que nous obtenons avec le gain et la perte de fonction de *vgll3*, à savoir des défauts de migration des cellules de crête neurale et de la formation du cartilage de la tête (Baltzinger et al., 2005; Pasqualetti et al., 2000) renforçant le lien entre *hoxa2* et *vgll3*. Ces résultats suggèrent que toutes ces molécules agissent probablement de concert pour réguler finement l'expression de *vgll3* afin de restreindre sa localisation au niveau du rhombomère 2.

Vgll3 régule la neurogenèse et est nécessaire à la formation du nerf trijumeau

Les stratégies de perte et de gain de fonction font apparaître clairement que *vgll3* est impliqué dans la régulation de la neurogenèse puisque le marqueur terminal de la différenciation neuronale *n-tubuline* est diminué. La diminution d'expression de *n-tubuline* est particulièrement évidente au niveau de la placode trigéminal qui correspond au futur nerf trijumeau, principal nerf de la sensibilité de la face.

Vgll3 régule l'expression de *n-tubuline* en aval de *sox2* car le gain de fonction ou la perte de fonction de *vgll3* ne modifie pas l'expression du gène proneural *sox2* dans l'embryon (résultats non montrés). Nous avons mis en évidence que FGF8 activait *vgll3* dans l'embryon comme attendu pour un gène cible de l'induction neurale (Aubin et al., 2004; De Robertis and Kuroda, 2004; Delaune et al., 2005; Fuentealba et al., 2007; Linker and Stern, 2004; Pera et al., 2003). *In vitro*, en calottes animales, noggin doit être associé à FGF pour obtenir l'induction de *vgll3* comme cela est observé pour *krox20*. Les facteurs FGF peuvent agir de façon dépendante ou indépendante de la voie BMP (Aubin et al., 2004; Delaune et al., 2005; Linker and Stern, 2004) (Figure 60).

La voie Wnt est aussi impliquée dans la neurogenèse en inhibant les facteurs BMPs et activant les inhibiteurs de la voie BMP comme noggin (Lamb et al., 1993). Nous n'avons pas d'évidence d'un effet direct de la voie Wnt sur l'expression de *vgll3* mais on peut au moins supposer un effet indirect *via pax3/zic1* qui sont induits par wnt et qui eux-mêmes peuvent stimuler *vgll3* (in vivo et en explant de calottes animales). Pour compléter les données, il serait intéressant de déterminer, par des expériences gain et perte de fonction, comment est situé *vgll3* par rapport aux facteurs proneuraux *neurogénine* et *NeuroD*.

Nous avons également montré que *vgll3* était impliqué dans la formation du nerf trijumeau. Les expériences de perte de fonction montrent une désorganisation de la placode trigéminal à des stades précoces et un défaut de formation de la branche ophtalmique du nerf à des stades plus tardifs. Les expériences gain de fonction induisent aussi une disparition de la placode dans des embryons de stade précoce. Les placodes crânielles sont des régions spécialisées de l'ectoderme qui sont à l'origine de divers ganglions sensoriels et induites sous l'effet d'un certain nombre de gènes comme *pax3*. (Stark et al., 1997). Deux données expérimentales suggèrent une implication de *vgll3* dans la formation de la placode trigéminal *via* un effet sur *pax3*. En effet, le knock-down de *vgll3* induit une diminution de l'expression de *pax3* au niveau de la placode alors que sa surexpression induit une forte stimulation de *pax3*. Ensuite, la surexpression du complexe *vgll3/tead1* en calotte animale induit une forte expression de *pax3*. Il serait intéressant de déterminer, par des approches gain et perte de fonction dans l'embryon et en calottes animales si *vgll3* régule l'expression d'autres gènes, tels que les gènes *six1*, *eya1* ou *pax6* connus pour être aussi impliqués dans la formation de cette placode (Schlosser, 2006; Zou et al., 2004).

Vgll3 est impliqué dans la migration des cellules de la crête neurale

La crête neurale est une population unique de cellules migratoires qui se forment à la frontière entre la plaque neurale et l'épiderme. Les protéines *pax3* et *zic1* sont des facteurs clefs dans l'induction et la spécification de la crête neurale (Milet and Monsoro-Burq, 2012; Sato et al., 2005). Nous avons montré que *vgll3* stimule fortement l'expression de *pax3* et *zic1* dans l'embryon et les cellules de calotte animales.

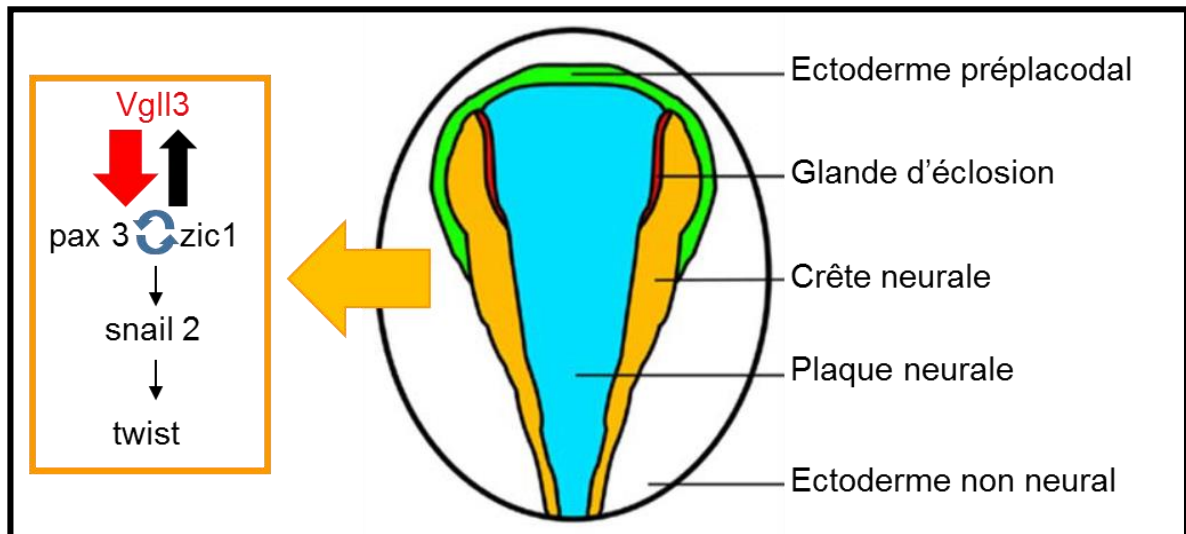


Figure 61 : Vgll3 est impliqué dans la formation de la crête neurale.

Représentation schématique d'un embryon au stade neurula précoce en vue dorsale (Hong and Saint-Jeannet, 2007). Il existe une régulation réciproque entre *vgl3* et les facteurs *pax3* et *zic1* impliqués dans l'induction de la crête neurale à des stades précoces. Le facteur *snail2* spécifique des cellules de la crête neurale et *twist* impliqués dans les phases précoces de migration sont également modifiés dans les embryons morphants et les embryons surexprimant *vgl3*.

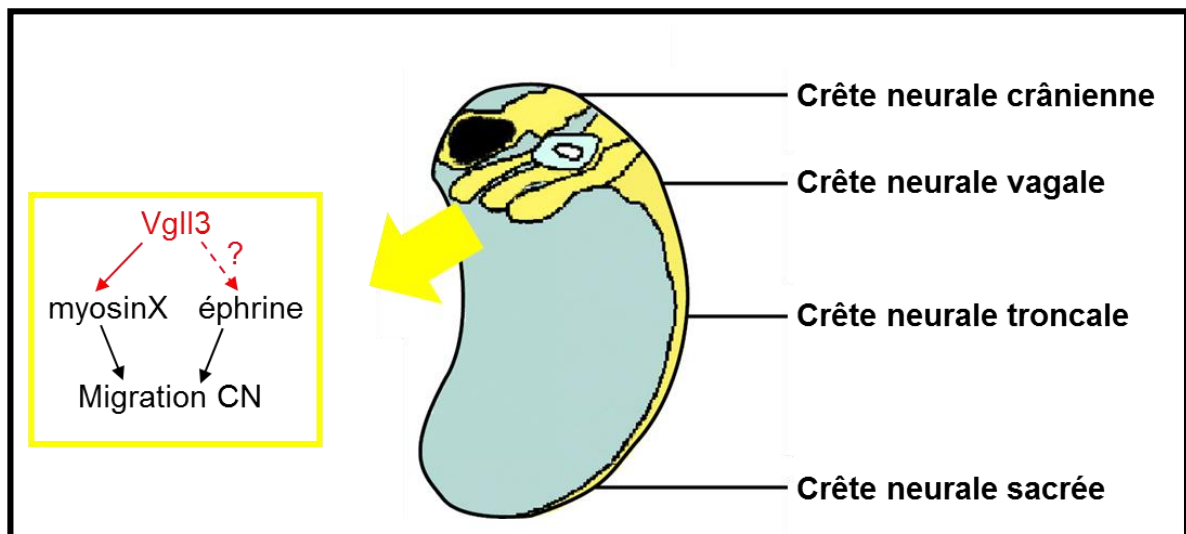


Figure 62 : Vgll3 est impliqué dans la migration de la crête neurale (CN).

Représentation schématique d'un embryon de xénope au stade 24 (Huang and Saint-Jeannet, 2004). Les embryons morphants présentent une diminution de l'expression de la myosinX impliquée dans les liaisons cellules-matrice.

Par ailleurs, l'analyse des embryons morphants suggère que *vgll3* pourrait être nécessaire à l'expansion des cellules progénitrices exprimant *pax3* et *snail2* à la frontière de la plaque neurale (Figure 61). Il a été montré que l'expression de *pax3* chevauchait celle de *snail2* et en partie de celle de *krox20* dans l'embryon de stade 13 jusqu'au stade 20 (Monsoro-Burq et al., 2005). Nous avons observé que *vgll3* et *krox20* sont co-exprimés dans le cerveau postérieur au stade 13 avant l'individualisation des rhombomères. *Vgll3* et *pax3* pourraient avoir un domaine d'expression commun, supportant ainsi une relation directe entre eux. Cette hypothèse est confortée par l'existence d'une séquence MCAT, site de liaison du facteur TEAD, identifiée dans le promoteur du gène *pax3* (Gee et al., 2011). La confirmation d'un effet direct de *vgll3* sur l'expression de *pax3* pourrait être testée dans des expériences de gain de fonction avec des embryons traités avec la cycloheximide, l'inhibiteur de synthèse protéique.

Nous avons démontré que *vgll3* est nécessaire à la migration des cellules de la crête neurale. Plusieurs expériences confortent cette conclusion. Les embryons morphants présentent une diminution de l'expression de *twist* qui est un marqueur spécifique des arcs branchiaux et un régulateur de la migration cellulaire. Les cellules non seulement ne migrent pas mais elles ne se ségrègent pas lors des étapes précoces pour former les futurs courants de migration. Par ailleurs, les cellules de crêtes neurales issues d'embryons morphants *vgll3* présentent un défaut de migration *in vitro* sur matrice de fibronectine. Dans ces expériences, les cellules apparaissent rondes et ne s'étalent pas sur le support de fibronectine. La migration des cellules est dépendante des interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire et pendant ce processus, les cellules augmentent leur adhésion en s'étalant sur la matrice. La protéine myosinX est nécessaire à l'adhésion des cellules de la crête neurale à la matrice extracellulaire (Hwang et al., 1993; Nie et al., 2009). Le knock-down de *vgll3* induit dans l'embryon une diminution de l'expression de *myosinX* qui est confirmée en calottes animales (Figure 62). Ceci suggère un rôle de *vgll3* dans la diminution de la migration des cellules de la crête neurale *via* l'inhibition de l'expression de *myosinX*. Dans les cellules de mammifères, la myosinX régule la translocation de la β -intégrine sur les pointes des filopodes et stimule l'interaction des cellules avec la matrice (Nie et al., 2009; Zhang et al., 2004). Il serait intéressant de déterminer si l'expression de

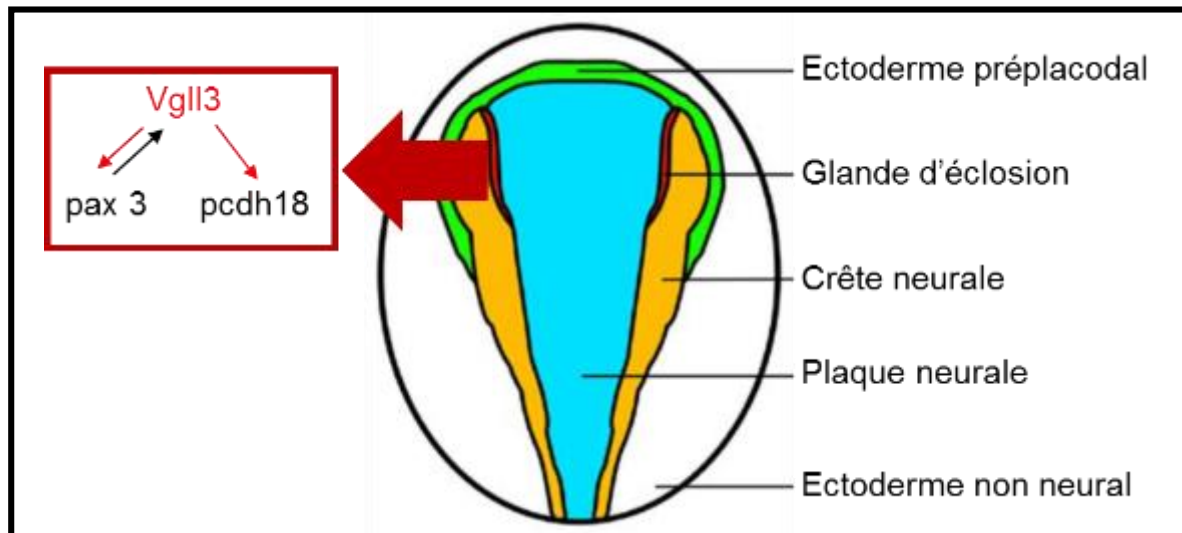


Figure 63 : Vgll3 est impliqué dans la formation de la glande d'éclosion.

Représentation schématique d'un embryon au stade *neurula* précoce en vue dorsale (Hong and Saint-Jeannet, 2007). *Pax3* est exprimé au niveau de la glande d'éclosion et son expression est modifiée dans les embryons morphants ou dans les embryons surexprimant *vgll3*. Vgll3 agit sur *pcdh18* qui est impliqué dans la formation de la glande d'éclosion.

la β -intégrine est modulée par *vgll3*. La perte de fonction de *vgll3* dans l'embryon présente un phénotype très similaire à celui observé pour la *myosinX*, à savoir un retard de migration des cellules de la crête neurale dans les arcs branchiaux et une inhibition de la croissance du nerf trijumeau (Hwang et al., 1993; Nie et al., 2009). Ceci conforte l'hypothèse d'un rôle de *vgll3* dans la migration des cellules de la crête neurale en régulant l'expression de la *myosinX*.

Les éphrines et leurs récepteurs sont également impliqués dans la migration des cellules de la crête neurale (Adams et al., 2001; Baker and Antin, 2003; Davy et al., 2004; Helbling et al., 1998; Mellott and Burke, 2008; Smith et al., 1997). Il serait intéressant de déterminer, par des approches gain de fonction et perte de fonction, si *vgll3* régule l'expression des éphrines perturbant ainsi en cascade la migration des cellules.

Les embryons morphants *vgll3* présentent une désorganisation au niveau de leur glande d'éclosion comme le montre l'expression de *pax3* et *zic1* (Figure 63). Il a été montré chez le poisson zèbre que la protocadhérine *pcdh18* jouait un rôle important dans la formation de la glande d'éclosion (Aamar and Dawid, 2008). Nos expériences établissent que *pcdh18* est régulée par *vgll3 in vivo* dans l'embryon et en calotte animale suggérant son implication dans la formation de la glande d'éclosion.

Les expériences de gain de fonction et perte de fonction de *vgll3* donnent des résultats similaires en termes de phénotypes. Une explication potentielle est que la fonction de *vgll3* dépend de son association avec un ou d'autres protéines et que toute modification de la stœchiométrie des différents partenaires affecte la fonction activatrice de *vgll3*.

Vgll3 est essentiel au développement cranio-facial

Les cellules de la crête neurale sont à l'origine de nombreux dérivés tels que le cartilage et les muscles de la face. Les embryons morphants *vgll3* présentent des défauts de formation du cartilage de la tête qui peuvent être la conséquence directe d'un défaut de migration des cellules de la crête neurale. Il est connu que *snail2* et *twist1* sont nécessaires à la formation du mésoderme et à l'induction de la crête neurale dans différentes espèces. Des mutations de *snail2* entraînent une malformation du mésoderme (Leptin, 1991). *Twist1*, quant à lui, est nécessaire à la migration des cellules de la crête neurale et sa diminution entraîne des dysplasies squelettiques (Miraoui and Marie, 2010; Soo et al., 2002).

Toute perturbation dans la formation ou la migration des cellules de la crête neurale peut être à l'origine de pathologies ou neurocristopathies. Ainsi des mutations dans le gène *pax3* sont à l'origine du syndrome de Waardenburg (Madiha and Khaled, 2015). La fonction de *vgll3* dans la migration des cellules de la crête neurale en fait un excellent gène candidat pour les maladies induites par les cellules des crêtes neurales et il serait intéressant d'analyser son expression dans différentes neurocristopathies.

De manière intéressante, il a été rapporté chez un patient présentant une délétion d'une portion du chromosome 3, portant le gène *VGLL3*, des traits phénotypiques qui peuvent évoquer un défaut dans la formation ou la migration des cellules de crêtes neurales (Gat-Yablonski et al., 2011).

ETS1 est un nouveau partenaire de *vgll3*

Vgll3, comme les autres membres de la famille vestigial-like, possède un domaine Tondu qui lui permet de se lier aux protéines Tead. Nous avons démontré qu'effectivement, *vgll3* pouvait se lier *in vivo* dans l'embryon aux protéines tead. Il s'agit ici de la première démonstration de l'interaction entre *vgll3* et Tead. La surexpression de *vgll3* stimule fortement l'expression de *pax3* et *zic1* dans l'embryon et dans les calottes animales. Cependant, en calotte animale, cette stimulation n'est effective qu'avec *tead1* mais pas *tead2*, suggérant que le partenaire préférentiel de *vgll3 in vivo* serait plutôt *tead1*. La surexpression de *tead1 in vivo* stimule l'expression de *pax3* plus faiblement que *vgll3* (Gee et al., 2011, nos résultats). Ceci confirme la faible capacité activatrice des protéines tead et de l'importance de se complexer avec des cofacteurs comme vestigial-like ou YAP1/TAZ qui contiennent un domaine de transactivation. La surexpression de *vgll3* dans des embryons knock-down pour *tead1/tead2* induit une stimulation de *pax3* aussi importante que la surexpression dans des embryons sauvages. Il en est de même lors de la surexpression d'une protéine *vgll3* dont le domaine Tondu a été muté. Ceci laisse supposer que l'activation de *pax3* par *vgll3* peut être en partie indépendante de sa liaison à *tead1*. Les protéines TEAD1 se fixent sur une séquence régulatrice consensus du type 5'-A/TGGAATGT/C-3' (ou 5'-A/GCATTCCA/T-3'). Or le cœur de cette séquence 5'-GGAA-3' est un site consensus parfait pour les facteurs de transcription de la famille ETS. Parmi ceux-ci, la protéine *ets1* est exprimée dans les cellules des crêtes neurales crâniennes et décrite comme impliquée dans leur migration (Gao et al., 2010; Theveneau et al., 2007; Wang et al., 2015). Nous avons montré que *vgll3* est capable d'interagir avec *ets1* dans l'embryon

et que le complexe peut activer en cellules en culture un gène rapporteur. *Vgll3* peut donc se lier à *tead1* ou *ets1* dans l'embryon. On peut supposer que la formation des *vgll3/tead1* ou *vgll3/ets1* dépend de l'affinité relative des protéines et de leur niveau d'expression selon le contexte cellulaire. Il sera important de définir qu'elle est la contribution relative des complexes *vgll3/tead1* et *vgll3/ets1* aux processus de formation et de migration des cellules de crêtes neurales. Ceci reposera sur des expériences de perte de fonction avec différentes combinaisons de morpholinos *ets1* et *vgll3* et l'analyse de l'expression de *pax3* et *twist*. Il faudra aussi déterminer quels sont les domaines respectifs sur chacune des protéines *vgll3* et *ets1* impliqués dans la formation du complexe.

Vgll3 et cancers

Il a été montré que *vgll3* présentait des caractères de type oncogène dans les sarcomes des tissus mous (Helias-Rodzewicz et al., 2010), cancers qui se développent dans les tissus conjonctifs et forment des métastases. Les cellules cancéreuses métastatiques ont des caractéristiques analogues à celles des cellules de la crête neurale et des mutations dans le gène *twist* sont observées dans diverses cellules cancéreuses humaines (Kuphal et al., 2005; Kuriyama and Mayor, 2008; Yang et al., 2004). Nous n'avons pas observé d'effet *in vivo* de *vgll3* sur la prolifération ni sur l'apoptose. Ceci conforte l'hypothèse que *vgll3* pourrait avoir un rôle dans la migration des cellules métastatiques qui ont les caractéristiques des cellules de crêtes neurales. Il serait intéressant de déterminer si le gain ou la perte de fonction de *VGLL3* dans différentes lignées cancéreuses humaines affectent leurs propriétés de migration voire d'invasion tumorale. Ce type d'expériences pourrait ainsi être réalisé dans des lignées de cellules cancéreuses de type sarcomes.

Par ailleurs, une étude contradictoire a émis l'hypothèse que *VGLL3* pourrait être un gène suppresseur de tumeurs dans le cas de cancer ovarien (Gambaro et al., 2013). Les mécanismes sont encore inconnus mais il est possible que cet effet tumoral passe par la voie Hippo. En effet, des travaux récents ont montré que la protéine *VGLL4* pouvait se lier à *TEAD* et bloquer l'effet oncogénique du complexe *TEAD/YAP1* de la voie hippo (Guo et al., 2013; Koontz et al., 2013). Aucune étude à ce jour n'a montré l'implication de *VGLL3* dans la voie Hippo, mais on peut émettre l'hypothèse qu'elle pourrait avoir aussi la capacité d'interagir avec *TEAD* et bloquer cette voie et agir dans certaines conditions comme suppresseur de tumeur.

Conclusion générale

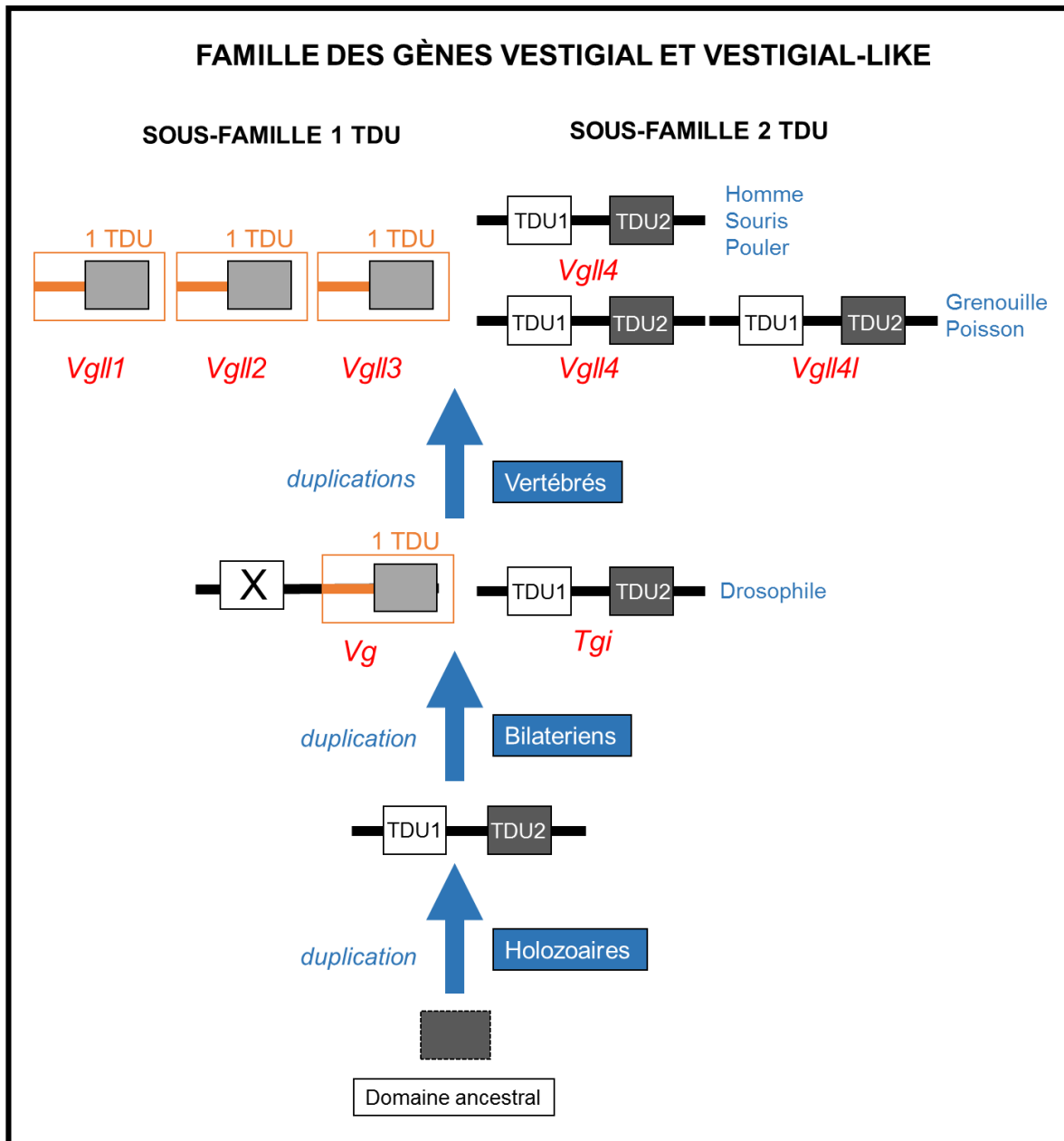


Figure 64 : Schéma hypothétique de l'évolution du domaine Tondou.

Un domaine Tondou ancestral de 10 acides aminés a évolué par duplication pour donner chez les Holozoaires une protéine possédant deux domaines Tondou TDU1 et TDU2. Une duplication lors de l'émergence des bilatériens a donné deux protéines : Tgi avec les deux domaines Tondou TDU1 et TDU2 et Vg avec un domaine Tondou de 24 acides aminés correspondant au domaine TDU2 flanqué d'une séquence de 14 acides aminés, le domaine TDU1 quant à lui a été perdu. L'émergence des vertébrés est concomitante à une double duplication des génomes et l'apparition de trois protéines Vgll1-3 avec un seul domaine Tondou. Les protéines Vgll4 à deux domaines Tondou n'ont pas subi de duplication dans les lignages mammifères. Dans le lignage commun aux amphibiens et aux poissons, la duplication a donné les protéines Vgll4 et Vgll4l.

Les travaux réalisés au cours de ma thèse ont permis de synthétiser les connaissances actuelles sur la structure et la fonction des gènes *vestigial-like* dans les différents modèles. Les protéines *vestigial* sont regroupées en deux sous-familles, la première comprend les protéines possédant un seul domaine Tondu de 24 acides aminés (TDU) (*vgll1-3/Vg*) et la seconde contient les protéines avec deux domaines Tondu (TDU1 et TDU2) de 10 acides aminés chacun (*vgll4/Tgi*). Les domaines Tondu permettent l'interaction entre les protéines *vestigial* et les facteurs de transcription de la famille TEAD. Les protéines *Vestigial* sont apparues très tôt au cours de l'évolution et la protéine ancestrale possédait un seul domaine TDU qui a été dupliqué pour donner une protéine de type *vgll4/Tgi* avec deux domaines Tondu. Les protéines *vgll1-3/Vg* contenant un seul domaine sont apparues cours de la transition à l'origine des bilatériens. La conservation totale du motif VxxHF entre les domaines TDU2 et TDU permet de faire l'hypothèse que le domaine TDU a pour origine la duplication du domaine ancestral TDU2 puis le recrutement d'une région contigüe de 14 acides aminés (Figure 64 et Figure 1 de la revue Simon et al., 2015).

Les études fonctionnelles réalisées au cours de ma thèse ont permis d'établir pour la première fois la fonction des gènes *vgll3* et *vgll4* au cours du développement embryonnaire d'un vertébré. Les gènes *vgll3* et *vgll4* sont nécessaires à la mise en place du système nerveux et à la formation des cellules de la crête neurale. Au stade neurula, *vgll3* et *vgll4* possèdent des profils d'expression spécifiques, *vgll3* est exprimé dans le rhombomère 2 du cerveau postérieur et *vgll4* est exprimé au niveau de la plaque neurale et des bourrelets neuraux. Nous avons étudié leur fonction dans la neurogenèse précoce et la formation de la crête neurale par des expériences de perte de fonction et de gain de fonction. *Vgll4* a une fonction très précoce dans l'étape de la détermination neurale car les embryons morphants présentent une diminution de l'expression du facteur proneural neurogénine. Les deux gènes *vgll3* et *vgll4* sont tous deux impliqués dans la formation de la placode trigéminal et la formation du nerf trijumeau à des stades plus tardifs dans le cas *vgll3*.

Vgll3 et *vgll4* sont aussi impliqués dans la formation de la crête neurale et de leurs dérivés. La perte de fonction de *vgll3* ou *vgll4* entraîne une diminution des marqueurs spécifiques des cellules de la crête neurale *pax 3* et *snail2*. *Vgll3* est plus particulièrement impliqué dans la migration des cellules de la crête neurale comme

nous l'avons confirmé dans des tests de migration *in vitro*. La surexpression de *vgll3* et de *vgll4* dans les embryons induisent une forte expression du marqueur *pax3*. Cependant, les deux gènes n'agissent pas de la même façon sur le gène *zic1*. Les embryons morphants *vgll3* présentent une diminution de l'expression de *zic1* alors que dans les embryons morphants *vgll4*, l'expression de *zic1* est augmentée. Les deux gènes sont impliqués dans la formation du cartilage de la face qui est l'un des dérivés majeur des cellules de la crête neurale. *Vgll3* et *vgll4* ont des rôles similaires dans la neurogenèse précoce et la formation des cellules de la crête neurale mais il reste à établir s'ils utilisent les mêmes voies de signalisation pour exercer leur fonction ou s'ils se régulent entre eux. Des expériences de perte de fonction et de gain de fonction pourraient permettre de répondre à cette hypothèse. Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans la neurogenèse comme les voies BMP, Wnt, FGF et Notch. *Vgll4* semble agir sur la voie Notch et *vgll3* est régulé par FGF8. Nous avons identifié dans la séquence protéique de *vgll4* plusieurs sites conservés de phosphorylation par la protéine kinase GSK connue pour réguler la voie wnt et la neurogenèse (Em and Zhou, 2010). Il serait intéressant de déterminer précisément quelle voies de signalisation régulent les gènes *vgll3* et *vgll4* et confirmer ou non s'il existe une relation entre les deux gènes.

Nos travaux suggèrent que le niveau d'expression de *vgll4* doit être régulé de manière très fine dans l'embryon pour éviter par exemple, l'activation de la voie NOTCH et le blocage de la neurogenèse. La régulation post-transcriptionnelle *via* les microARN (miR) est un des moyens de réguler finement l'expression des protéines. Les microARN sont des ARN non codants de 20 à 25 nucléotides qui contrôlent la stabilité et la traduction des ARNm (Ambros, 2004; Bartel, 2004). Ils sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires comme la prolifération et la différenciation cellulaire. *miR9* est exprimé spécifiquement dans le cerveau embryonnaire et adulte et chez xénope il est impliqué dans la neurogenèse (Bonev et al., 2010 ; Lagos-Quintana et al., 2002; Krichevsky et al., 2003; Deo et al., 2006; Kapsimali et al., 2007). Nous avons identifié dans la région 3'UTR de l'ARNm *vgll4* une séquence de reconnaissance pour *miR9* qui est très conservée et présente dans les ARNm humain et souris. D'autre part, la région promotrice des gènes *miR9* xénope et mammifères possède des séquences de reconnaissance de type M-CAT cibles de TEAD. Ceci permet de faire l'hypothèse que *vgll4* pourrait réguler la neurogenèse *via* la production

de miR9 tout en étant sujet à une régulation rétrocontrôle par ce même miRNA. Il serait intéressant de tester cette hypothèse par des approches gain de fonction et perte de fonction dans l'embryon et en cellules en culture.

Nous avons également étudié l'activité des protéines *vgll3* et *vgll4* sur un gène rapporteur possédant une séquence M-CAT qui fixe Tead. Dans ces expériences, *vgll3* se comporte comme un coactivateur et *vgll4* un corépresseur, suggérant que les complexes *vgll3*/tead et *vgll4*/tead n'ont pas les mêmes gènes cibles. Il est donc important de déterminer les gènes cibles pour chacun d'eux. Des expériences d'analyses de microarray ou de Chip seq pourraient apporter des éléments de réponse.

Un point important à résoudre est de déterminer si les gènes vestigial-like sont équivalents et redondants ou si chacun d'entre eux assure une fonction spécifique. Pour cela, des expériences de sauvetage des embryons morphants devront être réalisées avec chacune des protéines de la famille vestigial-like. Nous avons confirmé que *vgll4* assurait bien le sauvetage des morphants *vgll4* et il faudra réaliser ces mêmes expériences avec les ARNm *vgll1*, *vgll2* et *vgll3*. Nous avons montré que *vgll3* et *vgll4* peuvent interagir avec les facteurs de transcription Tead mais cette interaction n'est pas suffisante pour expliquer certains résultats. Ceci implique la possibilité d'interaction avec d'autres partenaires. C'est le cas pour *vgll3* qui, comme nous avons montré pour la première fois, interagit avec la protéine est-1. Ceci ajoute un degré de complexité supplémentaire dans les études fonctionnelles. Est-ce que les autres protéines de la famille vestigial interagissent avec *ets-1* ? Quelles sont les gènes cibles des complexes *vgll3*/*ets-1* vs *vgll3*/tead ? Quelle est l'affinité des protéines *vgll3* pour ses deux partenaires ? sont des questions qui se posent. Une analyse protéomique à haut débit pourrait permettre de résoudre la question des partenaires communs et ceux propres à chacune des protéines vestigial.

Chez les vertébrés, les gènes *vgll1*, *vgll2*, *vgll3* et *vgll4* ont des patrons d'expression différents. Chez le xénope, *vgll1* est exprimé dans l'épiderme, *vgll2* dans le muscle, *vgll3* dans le cerveau postérieur et *vgll4* est exprimé de manière ubiquitaire. Ces différentes expressions reflètent la présence de modules *cis*-régulateurs spécifiques pour chacun des gènes et qui contrôlent leur expression restreinte à un territoire donné de l'embryon. L'analyse des régions régulatrices des différents gènes

vestigial dans les autres espèces de vertébrés pourrait permettre de mettre en évidence les éléments communs régulateurs à chacun des gènes et comment ces séquences ont évolué.

Le domaine Tondu constitue la signature des protéines de la famille vestigial et leur confère la propriété de pouvoir interagir avec les facteurs TEAD. Hormis ce domaine, qui représente moins de 10% de la molécule, les protéines vgl1, vgl2, vgl3 et vgl4 des vertébrés ont très peu d'homologie entre elles. Même si on considère qu'elles peuvent être fonctionnellement interchangeables du fait de leur domaine Tondu, leur divergence de séquences en dehors de ce domaine est beaucoup trop importante pour ne pas être à l'origine de propriétés propres à chacune d'elle qu'il reste à découvrir.

Références

- Aamar, E., Dawid, I.B., 2008. Protocadherin-18a has a role in cell adhesion, behavior and migration in zebrafish development. *Developmental biology* 318, 335-346.
- Abu-Elmagd, M., Garcia-Morales, C., Wheeler, G.N., 2006. Frizzled7 mediates canonical Wnt signaling in neural crest induction. *Developmental biology* 298, 285-298.
- Adams, R.H., Diella, F., Hennig, S., Helmbacher, F., Deutsch, U., Klein, R., 2001. The cytoplasmic domain of the ligand ephrinB2 is required for vascular morphogenesis but not cranial neural crest migration. *Cell* 104, 57-69.
- Alarcon, C., Zaromytidou, A.I., Xi, Q., Gao, S., Yu, J., Fujisawa, S., Barlas, A., Miller, A.N., Manova-Todorova, K., Macias, M.J., Sapkota, G., Pan, D., Massague, J., 2009. Nuclear CDKs drive Smad transcriptional activation and turnover in BMP and TGF-beta pathways. *Cell* 139, 757-769.
- Alexander, T., Nolte, C., Krumlauf, R., 2009. Hox genes and segmentation of the hindbrain and axial skeleton. *Annual review of cell and developmental biology* 25, 431-456.
- Alfandari, D., Cousin, H., Gaultier, A., Hoffstrom, B.G., DeSimone, D.W., 2003. Integrin alpha5beta1 supports the migration of *Xenopus* cranial neural crest on fibronectin. *Developmental biology* 260, 449-464.
- Alfandari, D., Cousin, H., Gaultier, A., Smith, K., White, J.M., Darribere, T., DeSimone, D.W., 2001. *Xenopus* ADAM 13 is a metalloprotease required for cranial neural crest-cell migration. *Current biology : CB* 11, 918-930.
- Andrianopoulos, A., Timberlake, W.E., 1991. ATTS, a new and conserved DNA binding domain. *The Plant cell* 3, 747-748.
- Antonescu, C.R., Zhang, L., Nielsen, G.P., Rosenberg, A.E., Dal Cin, P., Fletcher, C.D., 2011. Consistent t(1;10) with rearrangements of TGFBR3 and MGEA5 in both myxoinflammatory fibroblastic sarcoma and hemosiderotic fibrolipomatous tumor. *Genes, chromosomes & cancer* 50, 757-764.
- Aoki, Y., Saint-Germain, N., Gyda, M., Magner-Fink, E., Lee, Y.H., Credidio, C., Saint-Jeannet, J.P., 2003. Sox10 regulates the development of neural crest-derived melanocytes in *Xenopus*. *Developmental biology* 259, 19-33.
- Ataliotis, P., Symes, K., Chou, M.M., Ho, L., Mercola, M., 1995. PDGF signalling is required for gastrulation of *Xenopus laevis*. *Development (Cambridge, England)* 121, 3099-3110.
- Aubin, J., Davy, A., Soriano, P., 2004. In vivo convergence of BMP and MAPK signaling pathways: impact of differential Smad1 phosphorylation on development and homeostasis. *Genes & development* 18, 1482-1494.
- Avruch, J., Zhou, D., Bardeesy, N., 2012. YAP oncogene overexpression supercharges colon cancer proliferation. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 11, 1090-1096.
- Aybar, M.J., Nieto, M.A., Mayor, R., 2003. Snail precedes slug in the genetic cascade required for the specification and migration of the *Xenopus* neural crest. *Development (Cambridge, England)* 130, 483-494.
- Ayer, D.E., Kretzner, L., Eisenman, R.N., 1993. Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. *Cell* 72, 211-222.
- Azacie, A., Larkin, S.B., Farrance, I.K., Grenningloh, G., Ordahl, C.P., 1996. DTEF-1, a novel member of the transcription enhancer factor-1 (TEF-1) multigene family. *The Journal of biological chemistry* 271, 8260-8265.
- Azzolin, L., Zanconato, F., Bresolin, S., Forcato, M., Basso, G., Bicciato, S., Cordenonsi, M., Piccolo, S., 2012. Role of TAZ as mediator of Wnt signaling. *Cell* 151, 1443-1456.
- Baker, J.C., Beddington, R.S., Harland, R.M., 1999. Wnt signaling in *Xenopus* embryos inhibits bmp4 expression and activates neural development. *Genes & development* 13, 3149-3159.
- Baker, R.K., Antin, P.B., 2003. Ephs and ephrins during early stages of chick embryogenesis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 228, 128-142.
- Baltzinger, M., Ori, M., Pasqualetti, M., Nardi, I., Rijli, F.M., 2005. Hoxa2 knockdown in *Xenopus* results in hyoid to mandibular homeosis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 234, 858-867.

- Bandura, J.L., Edgar, B.A., 2008. Yorkie and Scalloped: partners in growth activation. *Developmental cell* 14, 315-316.
- Barillot, W., Treguer, K., Faucheux, C., Fedou, S., Theze, N., Thiebaud, P., 2008. Induction and modulation of smooth muscle differentiation in *Xenopus* embryonic cells. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 237, 3373-3386.
- Barrallo-Gimeno, A., Nieto, M.A., 2005. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development (Cambridge, England)* 132, 3151-3161.
- Barrionuevo, M.G., Aybar, M.J., Tribulo, C., 2014. Two different vestigial like 4 genes are differentially expressed during *Xenopus laevis* development. *The International journal of developmental biology* 58, 369-377.
- Basch, M.L., Bronner-Fraser, M., Garcia-Castro, M.I., 2006. Specification of the neural crest occurs during gastrulation and requires Pax7. *Nature* 441, 218-222.
- Basu, S., Totty, N.F., Irwin, M.S., Sudol, M., Downward, J., 2003. Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. *Molecular cell* 11, 11-23.
- Batut, J., Vandel, L., Leclerc, C., Daguzan, C., Moreau, M., Neant, I., 2005. The Ca²⁺-induced methyltransferase xPRMT1b controls neural fate in amphibian embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 15128-15133.
- Baumgartner, R., Poernbacher, I., Buser, N., Hafen, E., Stocker, H., 2010. The WW domain protein Kibra acts upstream of Hippo in *Drosophila*. *Developmental cell* 18, 309-316.
- Beck, C.W., Izpisua Belmonte, J.C., Christen, B., 2009. Beyond early development: *Xenopus* as an emerging model for the study of regenerative mechanisms. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 238, 1226-1248.
- Belandia, B., Parker, M.G., 2000. Functional interaction between the p160 coactivator proteins and the transcriptional enhancer factor family of transcription factors. *The Journal of biological chemistry* 275, 30801-30805.
- Bell, D.M., Leung, K.K., Wheatley, S.C., Ng, L.J., Zhou, S., Ling, K.W., Sham, M.H., Koopman, P., Tam, P.P., Cheah, K.S., 1997. SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nature genetics* 16, 174-178.
- Benhamouche, S., Curto, M., Saotome, I., Gladden, A.B., Liu, C.H., Giovannini, M., McClatchey, A.I., 2010. Nf2/Merlin controls progenitor homeostasis and tumorigenesis in the liver. *Genes & development* 24, 1718-1730.
- Bennett, F.C., Harvey, K.F., 2006. Fat cadherin modulates organ size in *Drosophila* via the Salvador/Warts/Hippo signaling pathway. *Current biology : CB* 16, 2101-2110.
- Berberich, S.J., Cole, M.D., 1992. Casein kinase II inhibits the DNA-binding activity of Max homodimers but not Myc/Max heterodimers. *Genes & development* 6, 166-176.
- Bernard, F., Kasharov, P., Grenetier, S., Dutriaux, A., Zider, A., Silber, J., Lalouette, A., 2009. Integration of differentiation signals during indirect flight muscle formation by a novel enhancer of *Drosophila* vestigial gene. *Developmental biology* 332, 258-272.
- Bernard, F., Lalouette, A., Gullaud, M., Jeantet, A.Y., Cossard, R., Zider, A., Ferveur, J.F., Silber, J., 2003. Control of apterous by vestigial drives indirect flight muscle development in *Drosophila*. *Developmental biology* 260, 391-403.
- Betancur, P., Bronner-Fraser, M., Sauka-Spengler, T., 2010. Assembling neural crest regulatory circuits into a gene regulatory network. *Annual review of cell and developmental biology* 26, 581-603.
- Bhat, K.P., Salazar, K.L., Balasubramaniyan, V., Wani, K., Heathcock, L., Hollingsworth, F., James, J.D., Gumin, J., Diefes, K.L., Kim, S.H., Turski, A., Azodi, Y., Yang, Y., Doucette, T., Colman, H., Sulman, E.P., Lang, F.F., Rao, G., Copray, S., Vaillant, B.D., Aldape, K.D., 2011. The transcriptional coactivator TAZ regulates mesenchymal differentiation in malignant glioma. *Genes & development* 25, 2594-2609.

- Bi, W., Deng, J.M., Zhang, Z., Behringer, R.R., de Crombrughe, B., 1999. Sox9 is required for cartilage formation. *Nature genetics* 22, 85-89.
- Biggin, M.D., McGinnis, W., 1997. Regulation of segmentation and segmental identity by *Drosophila* homeoproteins: the role of DNA binding in functional activity and specificity. *Development (Cambridge, England)* 124, 4425-4433.
- Blatt, C., DePamphilis, M.L., 1993. Striking homology between mouse and human transcription enhancer factor-1 (TEF-1). *Nucleic acids research* 21, 747-748.
- Blaveri, E., Simko, J.P., Korkola, J.E., Brewer, J.L., Baehner, F., Mehta, K., Devries, S., Koppie, T., Pejavar, S., Carroll, P., Waldman, F.M., 2005. Bladder cancer outcome and subtype classification by gene expression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11, 4044-4055.
- Boedigheimer, M.J., Nguyen, K.P., Bryant, P.J., 1997. Expanded functions in the apical cell domain to regulate the growth rate of imaginal discs. *Developmental genetics* 20, 103-110.
- Bonnet, A., Dai, F., Brand-Saberi, B., Duprez, D., 2009. Vestigial-like 2 acts downstream of MyoD activation and is associated with skeletal muscle differentiation in chick myogenesis. *Mech Dev* 127, 120-136.
- Bonnet, A., Dai, F., Brand-Saberi, B., Duprez, D., 2010. Vestigial-like 2 acts downstream of MyoD activation and is associated with skeletal muscle differentiation in chick myogenesis. *Mechanisms of development* 127, 120-136.
- Bonstein, L., Elias, S., Frank, D., 1998. Paraxial-fated mesoderm is required for neural crest induction in *Xenopus* embryos. *Developmental biology* 193, 156-168.
- Brault, V., Moore, R., Kutsch, S., Ishibashi, M., Rowitch, D.H., McMahon, A.P., Sommer, L., Boussadia, O., Kemler, R., 2001. Inactivation of the beta-catenin gene by Wnt1-Cre-mediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial development. *Development (Cambridge, England)* 128, 1253-1264.
- Brewster, R., Lee, J., Ruiz i Altaba, A., 1998. Gli/Zic factors pattern the neural plate by defining domains of cell differentiation. *Nature* 393, 579-583.
- Brugmann, S.A., Pandur, P.D., Kenyon, K.L., Pignoni, F., Moody, S.A., 2004. Six1 promotes a placodal fate within the lateral neurogenic ectoderm by functioning as both a transcriptional activator and repressor. *Development (Cambridge, England)* 131, 5871-5881.
- Burglin, T.R., 1991. The TEA domain: a novel, highly conserved DNA-binding motif. *Cell* 66, 11-12.
- Butler, A.J., Ordahl, C.P., 1999. Poly(ADP-ribose) polymerase binds with transcription enhancer factor 1 to MCAT1 elements to regulate muscle-specific transcription. *Molecular and cellular biology* 19, 296-306.
- Cabrera, C.V., Martinez-Arias, A., Bate, M., 1987. The expression of three members of the achaete-scute gene complex correlates with neuroblast segregation in *Drosophila*. *Cell* 50, 425-433.
- Cagliero, J., Forget, A., Daldello, E., Silber, J., Zider, A., 2013. The Hippo kinase promotes Scalloped cytoplasmic localization independently of Warts in a CRM1/Exportin1-dependent manner in *Drosophila*. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 27, 1330-1341.
- Cai, J., Zhang, N., Zheng, Y., de Wilde, R.F., Maitra, A., Pan, D., 2010. The Hippo signaling pathway restricts the oncogenic potential of an intestinal regeneration program. *Genes & development* 24, 2383-2388.
- Caine, C., Kasharov, P., Silber, J., Lalouette, A., 2014. Mef2 interacts with the Notch pathway during adult muscle development in *Drosophila melanogaster*. *PloS one* 9, e108149.
- Callus, B.A., Verhagen, A.M., Vaux, D.L., 2006. Association of mammalian sterile twenty kinases, Mst1 and Mst2, with hSalvador via C-terminal coiled-coil domains, leads to its stabilization and phosphorylation. *The FEBS journal* 273, 4264-4276.

- Camargo, F.D., Gokhale, S., Johnnidis, J.B., Fu, D., Bell, G.W., Jaenisch, R., Brummelkamp, T.R., 2007. YAP1 increases organ size and expands undifferentiated progenitor cells. *Current biology : CB* 17, 2054-2060.
- Campbell, S., Inamdar, M., Rodrigues, V., Raghavan, V., Palazzolo, M., Chovnick, A., 1992. The scalloped gene encodes a novel, evolutionarily conserved transcription factor required for sensory organ differentiation in *Drosophila*. *Genes & development* 6, 367-379.
- Campbell, S.D., Duttaroy, A., Katzen, A.L., Chovnick, A., 1991. Cloning and characterization of the scalloped region of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 127, 367-380.
- Campos-Ortega, J.A., 1988. Cellular interactions during early neurogenesis of *Drosophila melanogaster*. *Trends in neurosciences* 11, 400-405.
- Cano, A., Perez-Moreno, M.A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M.J., del Barrio, M.G., Portillo, F., Nieto, M.A., 2000. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature cell biology* 2, 76-83.
- Carmona-Fontaine, C., Acuna, G., Ellwanger, K., Niehrs, C., Mayor, R., 2007. Neural crests are actively precluded from the anterior neural fold by a novel inhibitory mechanism dependent on Dickkopf1 secreted by the prechordal mesoderm. *Developmental biology* 309, 208-221.
- Castilla, M.A., Lopez-Garcia, M.A., Atienza, M.R., Rosa-Rosa, J.M., Diaz-Martin, J., Pecero, M.L., Vieites, B., Romero-Perez, L., Benitez, J., Calcabrini, A., Palacios, J., 2014. VGLL1 expression is associated with a triple-negative basal-like phenotype in breast cancer. *Endocrine-related cancer* 21, 587-599.
- Chambers, D., Wilson, L.J., Alfonsi, F., Hunter, E., Saxena, U., Blanc, E., Lumsden, A., 2009. Rhombomere-specific analysis reveals the repertoire of genetic cues expressed across the developing hindbrain. *Neural Dev* 4, 6.
- Chan, E.H., Nousiainen, M., Chalamalasetty, R.B., Schafer, A., Nigg, E.A., Sillje, H.H., 2005. The Ste20-like kinase Mst2 activates the human large tumor suppressor kinase Lats1. *Oncogene* 24, 2076-2086.
- Chan, S.W., Lim, C.J., Chen, L., Chong, Y.F., Huang, C., Song, H., Hong, W., 2011a. The Hippo pathway in biological control and cancer development. *J Cell Physiol* 226, 928-939.
- Chan, S.W., Lim, C.J., Chong, Y.F., Pobbati, A.V., Huang, C., Hong, W., 2011b. Hippo pathway-independent restriction of TAZ and YAP by angiomin. *The Journal of biological chemistry* 286, 7018-7026.
- Chan, S.W., Lim, C.J., Guo, K., Ng, C.P., Lee, I., Hunziker, W., Zeng, Q., Hong, W., 2008. A role for TAZ in migration, invasion, and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cancer research* 68, 2592-2598.
- Chan, S.W., Lim, C.J., Loo, L.S., Chong, Y.F., Huang, C., Hong, W., 2009. TEADs mediate nuclear retention of TAZ to promote oncogenic transformation. *The Journal of biological chemistry* 284, 14347-14358.
- Chang, C., Hemmati-Brivanlou, A., 1998. Neural crest induction by Xwnt7B in *Xenopus*. *Developmental biology* 194, 129-134.
- Chen, C.L., Gajewski, K.M., Hamaratoglu, F., Bossuyt, W., Sansores-Garcia, L., Tao, C., Halder, G., 2010a. The apical-basal cell polarity determinant Crumbs regulates Hippo signaling in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 15810-15815.
- Chen, D., Sun, Y., Wei, Y., Zhang, P., Rezaei, A.H., Teruya-Feldstein, J., Gupta, S., Liang, H., Lin, H.K., Hung, M.C., Ma, L., 2012. LIFR is a breast cancer metastasis suppressor upstream of the Hippo-YAP pathway and a prognostic marker. *Nature medicine* 18, 1511-1517.
- Chen, H.H., Maeda, T., Mullett, S.J., Stewart, A.F., 2004a. Transcription cofactor Vgl-2 is required for skeletal muscle differentiation. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* 39, 273-279.

- Chen, H.H., Mullett, S.J., Stewart, A.F., 2004b. Vgl-4, a novel member of the vestigial-like family of transcription cofactors, regulates alpha1-adrenergic activation of gene expression in cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* 279, 30800-30806.
- Chen, L., Chan, S.W., Zhang, X., Walsh, M., Lim, C.J., Hong, W., Song, H., 2010b. Structural basis of YAP recognition by TEAD4 in the hippo pathway. *Genes & development* 24, 290-300.
- Chen, L., Loh, P.G., Song, H., 2010c. Structural and functional insights into the TEAD-YAP complex in the Hippo signaling pathway. *Protein & cell* 1, 1073-1083.
- Chen, Z., Friedrich, G.A., Soriano, P., 1994. Transcriptional enhancer factor 1 disruption by a retroviral gene trap leads to heart defects and embryonic lethality in mice. *Genes & development* 8, 2293-2301.
- Cheung, M., Briscoe, J., 2003. Neural crest development is regulated by the transcription factor Sox9. *Development (Cambridge, England)* 130, 5681-5693.
- Cheung, M., Chaboissier, M.C., Mynett, A., Hirst, E., Schedl, A., Briscoe, J., 2005. The transcriptional control of trunk neural crest induction, survival, and delamination. *Developmental cell* 8, 179-192.
- Chitnis, A., Kintner, C., 1996. Sensitivity of proneural genes to lateral inhibition affects the pattern of primary neurons in *Xenopus* embryos. *Development (Cambridge, England)* 122, 2295-2301.
- Chitnis, A.B., 1995. The role of Notch in lateral inhibition and cell fate specification. *Molecular and cellular neurosciences* 6, 311-321.
- Cho, E., Feng, Y., Rauskolb, C., Maitra, S., Fehon, R., Irvine, K.D., 2006. Delineation of a Fat tumor suppressor pathway. *Nature genetics* 38, 1142-1150.
- Cho, E., Irvine, K.D., 2004. Action of fat, four-jointed, dachsous and dachs in distal-to-proximal wing signaling. *Development (Cambridge, England)* 131, 4489-4500.
- Chow, A., Hao, Y., Yang, X., 2010. Molecular characterization of human homologs of yeast MOB1. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 126, 2079-2089.
- Cody, N.A., Ouellet, V., Manderson, E.N., Quinn, M.C., Filali-Mouhim, A., Tellis, P., Zietarska, M., Provencher, D.M., Mes-Masson, A.M., Chevrette, M., Tonin, P.N., 2007. Transfer of chromosome 3 fragments suppresses tumorigenicity of an ovarian cancer cell line monoallelic for chromosome 3p. *Oncogene* 26, 618-632.
- Cody, N.A., Shen, Z., Ripeau, J.S., Provencher, D.M., Mes-Masson, A.M., Chevrette, M., Tonin, P.N., 2009. Characterization of the 3p12.3-pcen region associated with tumor suppression in a novel ovarian cancer cell line model genetically modified by chromosome 3 fragment transfer. *Molecular carcinogenesis* 48, 1077-1092.
- Coffman, C., Harris, W., Kintner, C., 1990. Xotch, the *Xenopus* homolog of *Drosophila* notch. *Science (New York, N.Y.)* 249, 1438-1441.
- Colombani, J., Polesello, C., Josue, F., Tapon, N., 2006. Dmp53 activates the Hippo pathway to promote cell death in response to DNA damage. *Current biology : CB* 16, 1453-1458.
- Cordenonsi, M., Zanconato, F., Azzolin, L., Forcato, M., Rosato, A., Frasson, C., Inui, M., Montagner, M., Parenti, A.R., Poletti, A., Daidone, M.G., Dupont, S., Basso, G., Bicciato, S., Piccolo, S., 2011. The Hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. *Cell* 147, 759-772.
- Cornell, R.A., Eisen, J.S., 2005. Notch in the pathway: the roles of Notch signaling in neural crest development. *Seminars in cell & developmental biology* 16, 663-672.
- D'Amico, L.A., Boujard, D., Coumailleau, P., 2013. The neurogenic factor NeuroD1 is expressed in post-mitotic cells during juvenile and adult *Xenopus* neurogenesis and not in progenitor or radial glial cells. *PloS one* 8, e66487.
- Das Thakur, M., Feng, Y., Jagannathan, R., Seppa, M.J., Skeath, J.B., Longmore, G.D., 2010. Ajuba LIM proteins are negative regulators of the Hippo signaling pathway. *Current biology : CB* 20, 657-662.
- Davidson, I., Xiao, J.H., Rosales, R., Staub, A., Chambon, P., 1988. The HeLa cell protein TEF-1 binds specifically and cooperatively to two SV40 enhancer motifs of unrelated sequence. *Cell* 54, 931-942.

- Davis, R.L., Turner, D.L., 2001. Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning. *Oncogene* 20, 8342-8357.
- Davy, A., Aubin, J., Soriano, P., 2004. Ephrin-B1 forward and reverse signaling are required during mouse development. *Genes & development* 18, 572-583.
- De Bellard, M.E., Ching, W., Gossler, A., Bronner-Fraser, M., 2002. Disruption of segmental neural crest migration and ephrin expression in delta-1 null mice. *Developmental biology* 249, 121-130.
- De Robertis, E.M., Kuroda, H., 2004. Dorsal-ventral patterning and neural induction in *Xenopus* embryos. *Annual review of cell and developmental biology* 20, 285-308.
- De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J.S., Schroeter, E.H., Schrijvers, V., Wolfe, M.S., Ray, W.J., Goate, A., Kopan, R., 1999. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398, 518-522.
- Deardorff, M.A., Tan, C., Saint-Jeannet, J.P., Klein, P.S., 2001. A role for frizzled 3 in neural crest development. *Development (Cambridge, England)* 128, 3655-3663.
- Dehal, P., Boore, J.L., 2005. Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. *PLoS biology* 3, e314.
- Deisboeck, T.S., Couzin, I.D., 2009. Collective behavior in cancer cell populations. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 31, 190-197.
- del Barrio, M.G., Nieto, M.A., 2002. Overexpression of Snail family members highlights their ability to promote chick neural crest formation. *Development (Cambridge, England)* 129, 1583-1593.
- Delanoue, R., Legent, K., Godefroy, N., Flagiello, D., Dutriaux, A., Vaudin, P., Becker, J.L., Silber, J., 2004. The *Drosophila* wing differentiation factor vestigial-scalloped is required for cell proliferation and cell survival at the dorso-ventral boundary of the wing imaginal disc. *Cell death and differentiation* 11, 110-122.
- Delaune, E., Lemaire, P., Kodjabachian, L., 2005. Neural induction in *Xenopus* requires early FGF signalling in addition to BMP inhibition. *Development (Cambridge, England)* 132, 299-310.
- Deng, H., Bell, J.B., Simmonds, A.J., 2010. Vestigial is required during late-stage muscle differentiation in *Drosophila melanogaster* embryos. *Molecular biology of the cell* 21, 3304-3316.
- Deng, H., Hughes, S.C., Bell, J.B., Simmonds, A.J., 2009. Alternative requirements for Vestigial, Scalloped, and Dmef2 during muscle differentiation in *Drosophila melanogaster*. *Molecular biology of the cell* 20, 256-269.
- Densham, R.M., O'Neill, E., Munro, J., Konig, I., Anderson, K., Kolch, W., Olson, M.F., 2009. MST kinases monitor actin cytoskeletal integrity and signal via c-Jun N-terminal kinase stress-activated kinase to regulate p21Waf1/Cip1 stability. *Molecular and cellular biology* 29, 6380-6390.
- Deshpande, N., Chopra, A., Rangarajan, A., Shashidhara, L.S., Rodrigues, V., Krishna, S., 1997. The human transcription enhancer factor-1, TEF-1, can substitute for *Drosophila* scalloped during wingblade development. *The Journal of biological chemistry* 272, 10664-10668.
- Dittmer, J., 2003. The biology of the Ets1 proto-oncogene. *Molecular cancer* 2, 29.
- Djiane, A., Zaessinger, S., Babaoglan, A.B., Bray, S.J., 2014. Notch inhibits Yorkie activity in *Drosophila* wing discs. *PloS one* 9, e106211.
- Dong, C., Wilhelm, D., Koopman, P., 2004. Sox genes and cancer. *Cytogenetic and genome research* 105, 442-447.
- Dong, J., Feldmann, G., Huang, J., Wu, S., Zhang, N., Comerford, S.A., Gayyed, M.F., Anders, R.A., Maitra, A., Pan, D., 2007. Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals. *Cell* 130, 1120-1133.
- Dorsam, R.T., Gutkind, J.S., 2007. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nature reviews. Cancer* 7, 79-94.

- Dottori, M., Gross, M.K., Labosky, P., Goulding, M., 2001. The winged-helix transcription factor Foxd3 suppresses interneuron differentiation and promotes neural crest cell fate. *Development (Cambridge, England)* 128, 4127-4138.
- Driever, W., Nusslein-Volhard, C., 1988. A gradient of bicoid protein in *Drosophila* embryos. *Cell* 54, 83-93.
- Dubois, L., Bally-Cuif, L., Crozatier, M., Moreau, J., Paquereau, L., Vincent, A., 1998. XCoE2, a transcription factor of the Col/Olf-1/EBF family involved in the specification of primary neurons in *Xenopus*. *Current biology : CB* 8, 199-209.
- Duboule, D., Morata, G., 1994. Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. *Trends in genetics : TIG* 10, 358-364.
- Duong, T.D., Erickson, C.A., 2004. MMP-2 plays an essential role in producing epithelial-mesenchymal transformations in the avian embryo. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 229, 42-53.
- Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., Elvassore, N., Piccolo, S., 2011. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* 474, 179-183.
- Edmondson, D.G., Lyons, G.E., Martin, J.F., Olson, E.N., 1994. Mef2 gene expression marks the cardiac and skeletal muscle lineages during mouse embryogenesis. *Development (Cambridge, England)* 120, 1251-1263.
- Egeblad, M., Werb, Z., 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature reviews. Cancer* 2, 161-174.
- Elms, P., Siggers, P., Napper, D., Greenfield, A., Arkell, R., 2003. Zic2 is required for neural crest formation and hindbrain patterning during mouse development. *Developmental biology* 264, 391-406.
- Endo, Y., Osumi, N., Wakamatsu, Y., 2002. Bimodal functions of Notch-mediated signaling are involved in neural crest formation during avian ectoderm development. *Development (Cambridge, England)* 129, 863-873.
- Faucheux, C., Naye, F., Treguer, K., Fedou, S., Thiebaud, P., Theze, N., 2010. Vestigial like gene family expression in *Xenopus*: common and divergent features with other vertebrates. *The International journal of developmental biology* 54, 1375-1382.
- Feng, Y., Irvine, K.D., 2007. Fat and expanded act in parallel to regulate growth through warts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 20362-20367.
- Fernandez, B.G., Gaspar, P., Bras-Pereira, C., Jezowska, B., Rebelo, S.R., Janody, F., 2011. Actin-Capping Protein and the Hippo pathway regulate F-actin and tissue growth in *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)* 138, 2337-2346.
- Fernandez, L.A., Northcott, P.A., Dalton, J., Fraga, C., Ellison, D., Angers, S., Taylor, M.D., Kenney, A.M., 2009. YAP1 is amplified and up-regulated in hedgehog-associated medulloblastomas and mediates Sonic hedgehog-driven neural precursor proliferation. *Genes & development* 23, 2729-2741.
- Fletcher, R.B., Baker, J.C., Harland, R.M., 2006. FGF8 spliceforms mediate early mesoderm and posterior neural tissue formation in *Xenopus*. *Development (Cambridge, England)* 133, 1703-1714.
- Fode, C., Gradwohl, G., Morin, X., Dierich, A., LeMeur, M., Goridis, C., Guillemot, F., 1998. The bHLH protein NEUROGENIN 2 is a determination factor for epibranchial placode-derived sensory neurons. *Neuron* 20, 483-494.
- Franco, P.G., Paganelli, A.R., Lopez, S.L., Carrasco, A.E., 1999. Functional association of retinoic acid and hedgehog signaling in *Xenopus* primary neurogenesis. *Development (Cambridge, England)* 126, 4257-4265.
- Friedl, P., Gilmour, D., 2009. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature reviews. Molecular cell biology* 10, 445-457.
- Friedl, P., Wolf, K., 2010. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *The Journal of cell biology* 188, 11-19.

- Fristrom, D., 1969. Cellular degeneration in the production of some mutant phenotypes in *Drosophila melanogaster*. *Molecular & general genetics* : MGG 103, 363-379.
- Fuentealba, L.C., Eivers, E., Ikeda, A., Hurtado, C., Kuroda, H., Pera, E.M., De Robertis, E.M., 2007. Integrating patterning signals: Wnt/GSK3 regulates the duration of the BMP/Smad1 signal. *Cell* 131, 980-993.
- Fujimi, T.J., Mikoshiba, K., Aruga, J., 2006. *Xenopus* Zic4: conservation and diversification of expression profiles and protein function among the *Xenopus* Zic family. *Developmental dynamics* : an official publication of the American Association of Anatomists 235, 3379-3386.
- Gambaro, K., Quinn, M.C., Wojnarowicz, P.M., Arcand, S.L., de Ladurantaye, M., Barres, V., Ripeau, J.S., Killary, A.M., Davis, E.C., Lavoie, J., Provencher, D.M., Mes-Masson, A.M., Chevette, M., Tonin, P.N., 2013. VGLL3 expression is associated with a tumor suppressor phenotype in epithelial ovarian cancer. *Molecular oncology* 7, 513-530.
- Gao, Z., Kim, G.H., Mackinnon, A.C., Flagg, A.E., Bassett, B., Earley, J.U., Svensson, E.C., 2010. Ets1 is required for proper migration and differentiation of the cardiac neural crest. *Development (Cambridge, England)* 137, 1543-1551.
- Gao, Z., Ure, K., Ables, J.L., Lagace, D.C., Nave, K.A., Goebbels, S., Eisch, A.J., Hsieh, J., 2009. Neurod1 is essential for the survival and maturation of adult-born neurons. *Nature neuroscience* 12, 1090-1092.
- Garcia-Bellido, A., 1975. Genetic control of wing disc development in *Drosophila*. *Ciba Foundation symposium* 0, 161-182.
- Garcia-Castro, M.I., Marcelle, C., Bronner-Fraser, M., 2002. Ectodermal Wnt function as a neural crest inducer. *Science (New York, N.Y.)* 297, 848-851.
- Gat-Yablonski, G., Frumkin-Ben David, R., Bar, M., Potievsky, O., Phillip, M., Lazar, L., 2011. Homozygous microdeletion of the POU1F1, CHMP2B, and VGLL3 genes in chromosome 3--a novel syndrome. *American journal of medical genetics. Part A* 155a, 2242-2246.
- Gee, S.T., Milgram, S.L., Kramer, K.L., Conlon, F.L., Moody, S.A., 2011. Yes-associated protein 65 (YAP) expands neural progenitors and regulates Pax3 expression in the neural plate border zone. *PloS one* 6, e20309.
- Genevet, A., Wehr, M.C., Brain, R., Thompson, B.J., Tapon, N., 2010. Kibra is a regulator of the Salvador/Warts/Hippo signaling network. *Developmental cell* 18, 300-308.
- Glantschnig, H., Rodan, G.A., Reszka, A.A., 2002. Mapping of MST1 kinase sites of phosphorylation. Activation and autophosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 277, 42987-42996.
- Glavic, A., Silva, F., Aybar, M.J., Bastidas, F., Mayor, R., 2004. Interplay between Notch signaling and the homeoprotein Xiro1 is required for neural crest induction in *Xenopus* embryos. *Development (Cambridge, England)* 131, 347-359.
- Golding, J.P., Sobieszczuk, D., Dixon, M., Coles, E., Christiansen, J., Wilkinson, D., Gassmann, M., 2004. Roles of erbB4, rhombomere-specific, and rhombomere-independent cues in maintaining neural crest-free zones in the embryonic head. *Developmental biology* 266, 361-372.
- Golding, J.P., Trainor, P., Krumlauf, R., Gassmann, M., 2000. Defects in pathfinding by cranial neural crest cells in mice lacking the neuregulin receptor ErbB4. *Nature cell biology* 2, 103-109.
- Golub, R., Adelman, Z., Clementi, J., Weiss, R., Bonasera, J., Servetnick, M., 2000. Evolutionarily conserved and divergent expression of members of the FGF receptor family among vertebrate embryos, as revealed by FGFR expression patterns in *Xenopus*. *Development genes and evolution* 210, 345-357.
- Goulev, Y., Fauny, J.D., Gonzalez-Marti, B., Flagiello, D., Silber, J., Zider, A., 2008. SCALLOPED interacts with YORKIE, the nuclear effector of the hippo tumor-suppressor pathway in *Drosophila*. *Current biology* : CB 18, 435-441.

- Graham, A., Begbie, J., McGonnell, I., 2004. Significance of the cranial neural crest. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 229, 5-13.
- Grenier, J., Teillet, M.A., Grifone, R., Kelly, R.G., Duprez, D., 2009. Relationship between neural crest cells and cranial mesoderm during head muscle development. *PloS one* 4, e4381.
- Grusche, F.A., Degoutin, J.L., Richardson, H.E., Harvey, K.F., 2011. The Salvador/Warts/Hippo pathway controls regenerative tissue growth in *Drosophila melanogaster*. *Developmental biology* 350, 255-266.
- Grzeschik, N.A., Parsons, L.M., Allott, M.L., Harvey, K.F., Richardson, H.E., 2010. Lgl, aPKC, and Crumbs regulate the Salvador/Warts/Hippo pathway through two distinct mechanisms. *Current biology : CB* 20, 573-581.
- Gunther, S., Mielcarek, M., Kruger, M., Braun, T., 2004. VITO-1 is an essential cofactor of TEF1-dependent muscle-specific gene regulation. *Nucleic acids research* 32, 791-802.
- Guo, T., Lu, Y., Li, P., Yin, M.X., Lv, D., Zhang, W., Wang, H., Zhou, Z., Ji, H., Zhao, Y., Zhang, L., 2013. A novel partner of Scalloped regulates Hippo signaling via antagonizing Scalloped-Yorkie activity. *Cell research* 23, 1201-1214.
- Gupta, M.P., Amin, C.S., Gupta, M., Hay, N., Zak, R., 1997. Transcription enhancer factor 1 interacts with a basic helix-loop-helix zipper protein, Max, for positive regulation of cardiac alpha-myosin heavy-chain gene expression. *Molecular and cellular biology* 17, 3924-3936.
- Gupta, M.P., Gupta, M., Dizon, E., Zak, R., 1996. Sympathetic control of cardiac myosin heavy chain gene expression. *Molecular and cellular biochemistry* 157, 117-124.
- Gusella, J.F., Ramesh, V., MacCollin, M., Jacoby, L.B., 1996. Neurofibromatosis 2: loss of merlin's protective spell. *Current opinion in genetics & development* 6, 87-92.
- Guss, K.A., Nelson, C.E., Hudson, A., Kraus, M.E., Carroll, S.B., 2001. Control of a genetic regulatory network by a selector gene. *Science* 292, 1164-1167.
- Halder, G., Carroll, S.B., 2001. Binding of the Vestigial co-factor switches the DNA-target selectivity of the Scalloped selector protein. *Development (Cambridge, England)* 128, 3295-3305.
- Halder, G., Polaczyk, P., Kraus, M.E., Hudson, A., Kim, J., Laughon, A., Carroll, S., 1998. The Vestigial and Scalloped proteins act together to directly regulate wing-specific gene expression in *Drosophila*. *Genes & development* 12, 3900-3909.
- Hallor, K.H., Sciot, R., Staaf, J., Heidenblad, M., Rydholm, A., Bauer, H.C., Astrom, K., Domanski, H.A., Meis, J.M., Kindblom, L.G., Panagopoulos, I., Mandahl, N., Mertens, F., 2009. Two genetic pathways, t(1;10) and amplification of 3p11-12, in myxoinflammatory fibroblastic sarcoma, haemosiderotic fibrolipomatous tumour, and morphologically similar lesions. *The Journal of pathology* 217, 716-727.
- Halloran, M.C., Berndt, J.D., 2003. Current progress in neural crest cell motility and migration and future prospects for the zebrafish model system. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 228, 497-513.
- Halperin, D.S., Pan, C., Lusic, A.J., Tontonoz, P., 2013. Vestigial-like 3 is an inhibitor of adipocyte differentiation. *Journal of lipid research* 54, 473-481.
- Hamaratoglu, F., Willecke, M., Kango-Singh, M., Nolo, R., Hyun, E., Tao, C., Jafar-Nejad, H., Halder, G., 2006. The tumour-suppressor genes NF2/Merlin and Expanded act through Hippo signalling to regulate cell proliferation and apoptosis. *Nature cell biology* 8, 27-36.
- Han, J., Ishii, M., Bringas, P., Jr., Maas, R.L., Maxson, R.E., Jr., Chai, Y., 2007. Concerted action of Msx1 and Msx2 in regulating cranial neural crest cell differentiation during frontal bone development. *Mechanisms of development* 124, 729-745.
- Harland, R., 2000. Neural induction. *Current opinion in genetics & development* 10, 357-362.
- Harland, R.M., 1991. In situ hybridization: an improved whole-mount method for *Xenopus* embryos. *Methods Cell Biol* 36, 685-695.
- Harland, R.M., Grainger, R.M., 2011. *Xenopus* research: metamorphosed by genetics and genomics. *Trends in genetics : TIG* 27, 507-515.

- Harris, M.L., Erickson, C.A., 2007. Lineage specification in neural crest cell pathfinding. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 236, 1-19.
- Harvey, K., Tapon, N., 2007. The Salvador-Warts-Hippo pathway - an emerging tumour-suppressor network. *Nature reviews. Cancer* 7, 182-191.
- Harvey, K.F., Pfleger, C.M., Hariharan, I.K., 2003. The *Drosophila* Mst ortholog, hippo, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell* 114, 457-467.
- Harvey, K.F., Zhang, X., Thomas, D.M., 2013. The Hippo pathway and human cancer. *Nature reviews. Cancer* 13, 246-257.
- Hatakeyama, J., Sakamoto, S., Kageyama, R., 2006. Hes1 and Hes5 regulate the development of the cranial and spinal nerve systems. *Developmental neuroscience* 28, 92-101.
- Hayashi, S., Ochi, H., Ogino, H., Kawasumi, A., Kamei, Y., Tamura, K., Yokoyama, H., 2014. Transcriptional regulators in the Hippo signaling pathway control organ growth in *Xenopus* tadpole tail regeneration. *Developmental biology* 396, 31-41.
- Heallen, T., Zhang, M., Wang, J., Bonilla-Claudio, M., Klysik, E., Johnson, R.L., Martin, J.F., 2011. Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size. *Science (New York, N.Y.)* 332, 458-461.
- Heasman, J., 2002. Morpholino oligos: making sense of antisense? *Developmental biology* 243, 209-214.
- Heeg-Truesdell, E., LaBonne, C., 2006. Neural induction in *Xenopus* requires inhibition of Wnt-beta-catenin signaling. *Developmental biology* 298, 71-86.
- Helbling, P.M., Tran, C.T., Brandli, A.W., 1998. Requirement for EphA receptor signaling in the segregation of *Xenopus* third and fourth arch neural crest cells. *Mechanisms of development* 78, 63-79.
- Helias-Rodzewicz, Z., Perot, G., Chibon, F., Ferreira, C., Lagarde, P., Terrier, P., Coindre, J.M., Aurias, A., 2010. YAP1 and VGLL3, encoding two cofactors of TEAD transcription factors, are amplified and overexpressed in a subset of soft tissue sarcomas. *Genes, chromosomes & cancer* 49, 1161-1171.
- Hellsten, U., Khokha, M.K., Grammer, T.C., Harland, R.M., Richardson, P., Rokhsar, D.S., 2007. Accelerated gene evolution and subfunctionalization in the pseudotetraploid frog *Xenopus laevis*. *BMC biology* 5, 31.
- Hemmati-Brivanlou, A., Kelly, O.G., Melton, D.A., 1994. Follistatin, an antagonist of activin, is expressed in the Spemann organizer and displays direct neuralizing activity. *Cell* 77, 283-295.
- Hemmati-Brivanlou, A., Melton, D.A., 1992. A truncated activin receptor inhibits mesoderm induction and formation of axial structures in *Xenopus* embryos. *Nature* 359, 609-614.
- Hensey, C., Gautier, J., 1997. A developmental timer that regulates apoptosis at the onset of gastrulation. *Mechanisms of development* 69, 183-195.
- Hergovich, A., Schmitz, D., Hemmings, B.A., 2006. The human tumour suppressor LATS1 is activated by human MOB1 at the membrane. *Biochemical and biophysical research communications* 345, 50-58.
- Hilman, D., Gat, U., 2011. The evolutionary history of YAP and the hippo/YAP pathway. *Molecular biology and evolution* 28, 2403-2417.
- Hoegg, S., Brinkmann, H., Taylor, J.S., Meyer, A., 2004. Phylogenetic timing of the fish-specific genome duplication correlates with the diversification of teleost fish. *Journal of molecular evolution* 59, 190-203.
- Hong, C.S., Park, B.Y., Saint-Jeannet, J.P., 2008. Fgf8a induces neural crest indirectly through the activation of Wnt8 in the paraxial mesoderm. *Development (Cambridge, England)* 135, 3903-3910.
- Hong, C.S., Saint-Jeannet, J.P., 2005. Sox proteins and neural crest development. *Seminars in cell & developmental biology* 16, 694-703.
- Hong, C.S., Saint-Jeannet, J.P., 2007. The activity of Pax3 and Zic1 regulates three distinct cell fates at the neural plate border. *Molecular biology of the cell* 18, 2192-2202.

- Hongo, I., Kengaku, M., Okamoto, H., 1999. FGF signaling and the anterior neural induction in *Xenopus*. *Developmental biology* 216, 561-581.
- Hornyak, T.J., Hayes, D.J., Chiu, L.Y., Ziff, E.B., 2001. Transcription factors in melanocyte development: distinct roles for Pax-3 and Mitf. *Mechanisms of development* 101, 47-59.
- Houtmeyers, R., Souopgui, J., Tejpar, S., Arkell, R., 2013. The ZIC gene family encodes multi-functional proteins essential for patterning and morphogenesis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 70, 3791-3811.
- Hsieh, J., 2012. Orchestrating transcriptional control of adult neurogenesis. *Genes & development* 26, 1010-1021.
- Hsu, T., Trojanowska, M., Watson, D.K., 2004. Ets proteins in biological control and cancer. *Journal of cellular biochemistry* 91, 896-903.
- Huang, J., Wu, S., Barrera, J., Matthews, K., Pan, D., 2005. The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* Homolog of YAP. *Cell* 122, 421-434.
- Huang, W., Lv, X., Liu, C., Zha, Z., Zhang, H., Jiang, Y., Xiong, Y., Lei, Q.Y., Guan, K.L., 2012. The N-terminal phosphodegron targets TAZ/WWTR1 protein for SCF β -TrCP-dependent degradation in response to phosphatidylinositol 3-kinase inhibition. *The Journal of biological chemistry* 287, 26245-26253.
- Huang, X., Saint-Jeannet, J.P., 2004. Induction of the neural crest and the opportunities of life on the edge. *Developmental biology* 275, 1-11.
- Hucl, T., Brody, J.R., Gallmeier, E., Iacobuzio-Donahue, C.A., Farrance, I.K., Kern, S.E., 2007. High cancer-specific expression of mesothelin (MSLN) is attributable to an upstream enhancer containing a transcription enhancer factor dependent MCAT motif. *Cancer research* 67, 9055-9065.
- Hwang, J.J., Chambon, P., Davidson, I., 1993. Characterization of the transcription activation function and the DNA binding domain of transcriptional enhancer factor-1. *The EMBO journal* 12, 2337-2348.
- Ikeda, S., Cunningham, L.A., Boggess, D., Hawes, N., Hobson, C.D., Sundberg, J.P., Naggert, J.K., Smith, R.S., Nishina, P.M., 2003. Aberrant actin cytoskeleton leads to accelerated proliferation of corneal epithelial cells in mice deficient for destrin (actin depolymerizing factor). *Human molecular genetics* 12, 1029-1037.
- Inoue, T., Hatayama, M., Tohmonda, T., Itohara, S., Aruga, J., Mikoshiba, K., 2004. Mouse *Zic5* deficiency results in neural tube defects and hypoplasia of cephalic neural crest derivatives. *Developmental biology* 270, 146-162.
- Ishibashi, M., Ang, S.L., Shiota, K., Nakanishi, S., Kageyama, R., Guillemot, F., 1995. Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects. *Genes & development* 9, 3136-3148.
- Ishikawa, H.O., Takeuchi, H., Haltiwanger, R.S., Irvine, K.D., 2008. Four-jointed is a Golgi kinase that phosphorylates a subset of cadherin domains. *Science (New York, N.Y.)* 321, 401-404.
- Jacquemin, P., Chen, Z., Martial, J.A., Davidson, I., 1999. Genomic structure and chromosomal mapping of the mouse transcription factor TEF-5 (Tead3) gene. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 10, 632-634.
- Jacquemin, P., Davidson, I., 1997. The Role of the TEF Transcription Factors in Cardiogenesis and Other Developmental Processes. *Trends in cardiovascular medicine* 7, 192-197.
- Jacquemin, P., Hwang, J.J., Martial, J.A., Dolle, P., Davidson, I., 1996. A novel family of developmentally regulated mammalian transcription factors containing the TEA/ATTS DNA binding domain. *The Journal of biological chemistry* 271, 21775-21785.
- Jacquemin, P., Oury, C., Belayew, A., Martial, J.A., 1994. A TEF-1 binding motif that interacts with a placental protein is important for the transcriptional activity of the hCS-B enhancer. *DNA and cell biology* 13, 1037-1045.

- Jaillon, O., Aury, J.M., Brunet, F., Petit, J.L., Stange-Thomann, N., Mauceli, E., Bouneau, L., Fischer, C., Ozouf-Costaz, C., Bernot, A., Nicaud, S., Jaffe, D., Fisher, S., Lutfalla, G., Dossat, C., Segurens, B., Dasilva, C., Salanoubat, M., Levy, M., Boudet, N., Castellano, S., Anthouard, V., Jubin, C., Castelli, V., Katinka, M., Vacherie, B., Biemont, C., Skalli, Z., Cattolico, L., Poulain, J., De Berardinis, V., Cruaud, C., Duprat, S., Brottier, P., Coutanceau, J.P., Gouzy, J., Parra, G., Lardier, G., Chapple, C., McKernan, K.J., McEwan, P., Bosak, S., Kellis, M., Volff, J.N., Guigo, R., Zody, M.C., Mesirov, J., Lindblad-Toh, K., Birren, B., Nusbaum, C., Kahn, D., Robinson-Rechavi, M., Laudet, V., Schachter, V., Quetier, F., Saurin, W., Scarpelli, C., Wincker, P., Lander, E.S., Weissenbach, J., Roest Crollius, H., 2004. Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature* 431, 946-957.
- Jeong, H., Bae, S., An, S.Y., Byun, M.R., Hwang, J.H., Yaffe, M.B., Hong, J.H., Hwang, E.S., 2010. TAZ as a novel enhancer of MyoD-mediated myogenic differentiation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24, 3310-3320.
- Jeziorska, D.M., Koentges, G., Vance, K.W., 2012. Novel cis-regulatory modules control expression of the Hairy and Enhancer of Split-1 (HES1) transcription factor in myoblasts. *The Journal of biological chemistry* 287, 5687-5697.
- Jiang, S.W., Desai, D., Khan, S., Eberhardt, N.L., 2000. Cooperative binding of TEF-1 to repeated GGAATG-related consensus elements with restricted spatial separation and orientation. *DNA and cell biology* 19, 507-514.
- Jiang, S.W., Eberhardt, N.L., 1995. Involvement of a protein distinct from transcription enhancer factor-1 (TEF-1) in mediating human chorionic somatomammotropin gene enhancer function through the GT-IIC enhanson in choriocarcinoma and COS cells. *The Journal of biological chemistry* 270, 13906-13915.
- Jiang, S.W., Wu, K., Eberhardt, N.L., 1999. Human placental TEF-5 transactivates the human chorionic somatomammotropin gene enhancer. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 13, 879-889.
- Jiang, W., Yao, F., He, J., Lv, B., Fang, W., Zhu, W., He, G., Chen, J., He, J., 2015. Downregulation of VGLL4 in the progression of esophageal squamous cell carcinoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 36, 1289-1297.
- Jiao, S., Wang, H., Shi, Z., Dong, A., Zhang, W., Song, X., He, F., Wang, Y., Zhang, Z., Wang, W., Wang, X., Guo, T., Li, P., Zhao, Y., Ji, H., Zhang, L., Zhou, Z., 2014. A peptide mimicking VGLL4 function acts as a YAP antagonist therapy against gastric cancer. *Cancer cell* 25, 166-180.
- Jin, H.S., Park, H.S., Shin, J.H., Kim, D.H., Jun, S.H., Lee, C.J., Lee, T.H., 2011. A novel inhibitor of apoptosis protein (IAP)-interacting protein, Vestigial-like (Vgl)-4, counteracts apoptosis-inhibitory function of IAPs by nuclear sequestration. *Biochemical and biophysical research communications* 412, 454-459.
- Johnson, C.W., Hernandez-Lagunas, L., Feng, W., Melvin, V.S., Williams, T., Artinger, K.B., 2011. Vgll2a is required for neural crest cell survival during zebrafish craniofacial development. *Developmental biology* 357, 269-281.
- Jonasson, F., Hardarson, S., Olafsson, B.M., Klintworth, G.K., 2007. Sveinsson chorioretinal atrophy/helicoid peripapillary chorioretinal degeneration: first histopathology report. *Ophthalmology* 114, 1541-1546.
- Jorda, M., Olmeda, D., Vinyals, A., Valero, E., Cubillo, E., Llorens, A., Cano, A., Fabra, A., 2005. Upregulation of MMP-9 in MDCK epithelial cell line in response to expression of the Snail transcription factor. *Journal of cell science* 118, 3371-3385.
- Jordan, M.A., Wilson, L., 1998. Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. *Current opinion in cell biology* 10, 123-130.
- Judson, R.N., Tremblay, A.M., Knopp, P., White, R.B., Urcia, R., De Bari, C., Zammit, P.S., Camargo, F.D., Wackerhage, H., 2012. The Hippo pathway member Yap plays a key

- role in influencing fate decisions in muscle satellite cells. *Journal of cell science* 125, 6009-6019.
- Justice, R.W., Zilian, O., Woods, D.F., Noll, M., Bryant, P.J., 1995. The *Drosophila* tumor suppressor gene *warts* encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes & development* 9, 534-546.
- Kamachi, Y., Uchikawa, M., Kondoh, H., 2000. Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends in genetics : TIG* 16, 182-187.
- Kanai, F., Marignani, P.A., Sarbassova, D., Yagi, R., Hall, R.A., Donowitz, M., Hisaminato, A., Fujiwara, T., Ito, Y., Cantley, L.C., Yaffe, M.B., 2000. TAZ: a novel transcriptional co-activator regulated by interactions with 14-3-3 and PDZ domain proteins. *The EMBO journal* 19, 6778-6791.
- Kanekar, S., Perron, M., Dorsky, R., Harris, W.A., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Vetter, M.L., 1997. Xath5 participates in a network of bHLH genes in the developing *Xenopus* retina. *Neuron* 19, 981-994.
- Kaneko, K.J., Kohn, M.J., Liu, C., DePamphilis, M.L., 2007. Transcription factor TEAD2 is involved in neural tube closure. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* 45, 577-587.
- Kango-Singh, M., Nolo, R., Tao, C., Verstreken, P., Hiesinger, P.R., Bellen, H.J., Halder, G., 2002. Shar-pei mediates cell proliferation arrest during imaginal disc growth in *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)* 129, 5719-5730.
- Karns, L.R., Kariya, K., Simpson, P.C., 1995. M-CAT, CArG, and Sp1 elements are required for alpha 1-adrenergic induction of the skeletal alpha-actin promoter during cardiac myocyte hypertrophy. Transcriptional enhancer factor-1 and protein kinase C as conserved transducers of the fetal program in cardiac growth. *The Journal of biological chemistry* 270, 410-417.
- Karpowicz, P., Perez, J., Perrimon, N., 2010. The Hippo tumor suppressor pathway regulates intestinal stem cell regeneration. *Development (Cambridge, England)* 137, 4135-4145.
- Kato, G.J., Lee, W.M., Chen, L.L., Dang, C.V., 1992. Max: functional domains and interaction with c-Myc. *Genes & development* 6, 81-92.
- Kengaku, M., Okamoto, H., 1993. Basic fibroblast growth factor induces differentiation of neural tube and neural crest lineages of cultured ectoderm cells from *Xenopus* gastrula. *Development (Cambridge, England)* 119, 1067-1078.
- Khalil, A.A., Friedl, P., 2010. Determinants of leader cells in collective cell migration. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* 2, 568-574.
- Kiecker, C., Niehrs, C., 2001. A morphogen gradient of Wnt/beta-catenin signalling regulates anteroposterior neural patterning in *Xenopus*. *Development (Cambridge, England)* 128, 4189-4201.
- Kim, C.H., Bae, Y.K., Yamanaka, Y., Yamashita, S., Shimizu, T., Fujii, R., Park, H.C., Yeo, S.Y., Huh, T.L., Hibi, M., Hirano, T., 1997. Overexpression of neurogenin induces ectopic expression of HuC in zebrafish. *Neuroscience letters* 239, 113-116.
- Kim, J., Sebring, A., Esch, J.J., Kraus, M.E., Vorwerk, K., Magee, J., Carroll, S.B., 1996. Integration of positional signals and regulation of wing formation and identity by *Drosophila* vestigial gene. *Nature* 382, 133-138.
- Klein, T., Arias, A.M., 1999. The vestigial gene product provides a molecular context for the interpretation of signals during the development of the wing in *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)* 126, 913-925.
- Knight, J.F., Shepherd, C.J., Rizzo, S., Brewer, D., Jhavar, S., Dodson, A.R., Cooper, C.S., Eeles, R., Falconer, A., Kovacs, G., Garrett, M.D., Norman, A.R., Shipley, J., Hudson, D.L., 2008. TEAD1 and c-Cbl are novel prostate basal cell markers that correlate with poor clinical outcome in prostate cancer. *British journal of cancer* 99, 1849-1858.
- Knight, R.D., Nair, S., Nelson, S.S., Afshar, A., Javidan, Y., Geisler, R., Rauch, G.J., Schilling, T.F., 2003. lockjaw encodes a zebrafish tfap2a required for early neural crest development. *Development (Cambridge, England)* 130, 5755-5768.
- Kolm, P.J., Apekin, V., Sive, H., 1997. *Xenopus* hindbrain patterning requires retinoid signaling. *Developmental biology* 192, 1-16.

- Kondoh, H., Uchikawa, M., Kamachi, Y., 2004. Interplay of Pax6 and SOX2 in lens development as a paradigm of genetic switch mechanisms for cell differentiation. *The International journal of developmental biology* 48, 819-827.
- Koontz, L.M., Liu-Chittenden, Y., Yin, F., Zheng, Y., Yu, J., Huang, B., Chen, Q., Wu, S., Pan, D., 2013. The Hippo effector Yorkie controls normal tissue growth by antagonizing scalloped-mediated default repression. *Developmental cell* 25, 388-401.
- Kos, R., Reedy, M.V., Johnson, R.L., Erickson, C.A., 2001. The winged-helix transcription factor FoxD3 is important for establishing the neural crest lineage and repressing melanogenesis in avian embryos. *Development (Cambridge, England)* 128, 1467-1479.
- Kroll, K.L., Amaya, E., 1996. Transgenic *Xenopus* embryos from sperm nuclear transplantations reveal FGF signaling requirements during gastrulation. *Development (Cambridge, England)* 122, 3173-3183.
- Krull, C.E., Lansford, R., Gale, N.W., Collazo, A., Marcelle, C., Yancopoulos, G.D., Fraser, S.E., Bronner-Fraser, M., 1997. Interactions of Eph-related receptors and ligands confer rostrocaudal pattern to trunk neural crest migration. *Current biology : CB* 7, 571-580.
- Krumlauf, R., 1994. Hox genes in vertebrate development. *Cell* 78, 191-201.
- Kudoh, T., Wilson, S.W., Dawid, I.B., 2002. Distinct roles for Fgf, Wnt and retinoic acid in posteriorizing the neural ectoderm. *Development (Cambridge, England)* 129, 4335-4346.
- Kuhl, M., Geis, K., Sheldahl, L.C., Pukrop, T., Moon, R.T., Wedlich, D., 2001. Antagonistic regulation of convergent extension movements in *Xenopus* by Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca²⁺ signaling. *Mechanisms of development* 106, 61-76.
- Kuo, J.S., Patel, M., Gamse, J., Merzdorf, C., Liu, X., Apekin, V., Sive, H., 1998. Opl: a zinc finger protein that regulates neural determination and patterning in *Xenopus*. *Development (Cambridge, England)* 125, 2867-2882.
- Kuphal, S., Palm, H.G., Poser, I., Bosserhoff, A.K., 2005. Snail-regulated genes in malignant melanoma. *Melanoma research* 15, 305-313.
- Kuriyama, S., Mayor, R., 2008. Molecular analysis of neural crest migration. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 363, 1349-1362.
- Kurrasch, D.M., Cheung, C.C., Lee, F.Y., Tran, P.V., Hata, K., Ingraham, H.A., 2007. The neonatal ventromedial hypothalamus transcriptome reveals novel markers with spatially distinct patterning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 13624-13634.
- LaBonne, C., Bronner-Fraser, M., 1998a. Induction and patterning of the neural crest, a stem cell-like precursor population. *J Neurobiol* 36, 175-189.
- LaBonne, C., Bronner-Fraser, M., 1998b. Neural crest induction in *Xenopus*: evidence for a two-signal model. *Development (Cambridge, England)* 125, 2403-2414.
- LaBonne, C., Bronner-Fraser, M., 2000. Snail-related transcriptional repressors are required in *Xenopus* for both the induction of the neural crest and its subsequent migration. *Developmental biology* 221, 195-205.
- Lagha, M., Sato, T., Regnault, B., Cumano, A., Zuniga, A., Licht, J., Relaix, F., Buckingham, M., 2010. Transcriptome analyses based on genetic screens for Pax3 myogenic targets in the mouse embryo. *BMC genomics* 11, 696.
- Lai, Z.C., Wei, X., Shimizu, T., Ramos, E., Rohrbaugh, M., Nikolaidis, N., Ho, L.L., Li, Y., 2005. Control of cell proliferation and apoptosis by mob as tumor suppressor, mats. *Cell* 120, 675-685.
- Lamar, J.M., Stern, P., Liu, H., Schindler, J.W., Jiang, Z.G., Hynes, R.O., 2012. The Hippo pathway target, YAP, promotes metastasis through its TEAD-interaction domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, E2441-2450.
- Lamb, T.M., Harland, R.M., 1995. Fibroblast growth factor is a direct neural inducer, which combined with noggin generates anterior-posterior neural pattern. *Development (Cambridge, England)* 121, 3627-3636.

- Lamb, T.M., Knecht, A.K., Smith, W.C., Stachel, S.E., Economides, A.N., Stahl, N., Yancopoulos, G.D., Harland, R.M., 1993. Neural induction by the secreted polypeptide noggin. *Science (New York, N.Y.)* 262, 713-718.
- Lander, R., Nasr, T., Ochoa, S.D., Nordin, K., Prasad, M.S., Labonne, C., 2013. Interactions between Twist and other core epithelial-mesenchymal transition factors are controlled by GSK3-mediated phosphorylation. *Nat Commun* 4, 1542.
- Lang, D., Chen, F., Milewski, R., Li, J., Lu, M.M., Epstein, J.A., 2000. Pax3 is required for enteric ganglia formation and functions with Sox10 to modulate expression of c-ret. *The Journal of clinical investigation* 106, 963-971.
- Lapi, E., Di Agostino, S., Donzelli, S., Gal, H., Domany, E., Rechavi, G., Pandolfi, P.P., Givol, D., Strano, S., Lu, X., Blandino, G., 2008. PML, YAP, and p73 are components of a proapoptotic autoregulatory feedback loop. *Molecular cell* 32, 803-814.
- Lea, R., Papalopulu, N., Amaya, E., Dorey, K., 2009. Temporal and spatial expression of FGF ligands and receptors during *Xenopus* development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 238, 1467-1479.
- Leclerc, C., Daguzan, C., Nicolas, M.T., Chabret, C., Duprat, A.M., Moreau, M., 1997. L-type calcium channel activation controls the in vivo transduction of the neuralizing signal in the amphibian embryos. *Mechanisms of development* 64, 105-110.
- Leclerc, C., Neant, I., Webb, S.E., Miller, A.L., Moreau, M., 2006. Calcium transients and calcium signalling during early neurogenesis in the amphibian embryo *Xenopus laevis*. *Biochimica et biophysica acta* 1763, 1184-1191.
- Lee, H.Y., Kleber, M., Hari, L., Brault, V., Suter, U., Taketo, M.M., Kemler, R., Sommer, L., 2004. Instructive role of Wnt/beta-catenin in sensory fate specification in neural crest stem cells. *Science (New York, N.Y.)* 303, 1020-1023.
- Lee, J.E., Hollenberg, S.M., Snider, L., Turner, D.L., Lipnick, N., Weintraub, H., 1995. Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science (New York, N.Y.)* 268, 836-844.
- Lee, J.H., Kim, T.S., Yang, T.H., Koo, B.K., Oh, S.P., Lee, K.P., Oh, H.J., Lee, S.H., Kong, Y.Y., Kim, J.M., Lim, D.S., 2008. A crucial role of WW45 in developing epithelial tissues in the mouse. *The EMBO journal* 27, 1231-1242.
- Lee, J.K., Cho, J.H., Hwang, W.S., Lee, Y.D., Reu, D.S., Suh-Kim, H., 2000. Expression of neuroD/BETA2 in mitotic and postmitotic neuronal cells during the development of nervous system. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 217, 361-367.
- Lee, K.P., Lee, J.H., Kim, T.S., Kim, T.H., Park, H.D., Byun, J.S., Kim, M.C., Jeong, W.I., Calvisi, D.F., Kim, J.M., Lim, D.S., 2010. The Hippo-Salvador pathway restrains hepatic oval cell proliferation, liver size, and liver tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 8248-8253.
- Lei, Q.Y., Zhang, H., Zhao, B., Zha, Z.Y., Bai, F., Pei, X.H., Zhao, S., Xiong, Y., Guan, K.L., 2008. TAZ promotes cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition and is inhibited by the hippo pathway. *Molecular and cellular biology* 28, 2426-2436.
- Leptin, M., 1991. twist and snail as positive and negative regulators during *Drosophila* mesoderm development. *Genes & development* 5, 1568-1576.
- Leve, C., Gajewski, M., Rohr, K.B., Tautz, D., 2001. Homologues of c-hairy1 (her9) and lunatic fringe in zebrafish are expressed in the developing central nervous system, but not in the presomitic mesoderm. *Development genes and evolution* 211, 493-500.
- Lewis, J.L., Bonner, J., Modrell, M., Ragland, J.W., Moon, R.T., Dorsky, R.I., Raible, D.W., 2004. Reiterated Wnt signaling during zebrafish neural crest development. *Development (Cambridge, England)* 131, 1299-1308.
- Li, H., Wang, Z., Zhang, W., Qian, K., Liao, G., Xu, W., Zhang, S., 2015a. VGLL4 inhibits EMT in part through suppressing Wnt/beta-catenin signaling pathway in gastric cancer. *Medical oncology (Northwood, London, England)* 32, 83.

- Li, N., Yu, N., Wang, J., Xi, H., Lu, W., Xu, H., Deng, M., Zheng, G., Liu, H., 2015b. miR-222/VGLL4/YAP-TEAD1 regulatory loop promotes proliferation and invasion of gastric cancer cells. *American journal of cancer research* 5, 1158-1168.
- Li, Z., Zhao, B., Wang, P., Chen, F., Dong, Z., Yang, H., Guan, K.L., Xu, Y., 2010. Structural insights into the YAP and TEAD complex. *Genes & development* 24, 235-240.
- Lian, I., Kim, J., Okazawa, H., Zhao, J., Zhao, B., Yu, J., Chinnaiyan, A., Israel, M.A., Goldstein, L.S., Abujarour, R., Ding, S., Guan, K.L., 2010. The role of YAP transcription coactivator in regulating stem cell self-renewal and differentiation. *Genes & development* 24, 1106-1118.
- Liem, K.F., Jr., Tremml, G., Roelink, H., Jessell, T.M., 1995. Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* 82, 969-979.
- Ling, C., Zheng, Y., Yin, F., Yu, J., Huang, J., Hong, Y., Wu, S., Pan, D., 2010. The apical transmembrane protein Crumbs functions as a tumor suppressor that regulates Hippo signaling by binding to Expanded. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 10532-10537.
- Linker, C., Stern, C.D., 2004. Neural induction requires BMP inhibition only as a late step, and involves signals other than FGF and Wnt antagonists. *Development (Cambridge, England)* 131, 5671-5681.
- Litsiou, A., Hanson, S., Streit, A., 2005. A balance of FGF, BMP and WNT signalling positions the future placode territory in the head. *Development (Cambridge, England)* 132, 4051-4062.
- Liu-Chittenden, Y., Huang, B., Shim, J.S., Chen, Q., Lee, S.J., Anders, R.A., Liu, J.O., Pan, D., 2012. Genetic and pharmacological disruption of the TEAD-YAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP. *Genes & development* 26, 1300-1305.
- Liu, B., Wang, Y., Melana, S.M., Pelisson, I., Najfeld, V., Holland, J.F., Pogo, B.G., 2001. Identification of a proviral structure in human breast cancer. *Cancer research* 61, 1754-1759.
- Liu, M., Pleasure, S.J., Collins, A.E., Noebels, J.L., Naya, F.J., Tsai, M.J., Lowenstein, D.H., 2000. Loss of BETA2/NeuroD leads to malformation of the dentate gyrus and epilepsy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 865-870.
- Liu, S., Umez-Goto, M., Murph, M., Lu, Y., Liu, W., Zhang, F., Yu, S., Stephens, L.C., Cui, X., Murrow, G., Coombes, K., Muller, W., Hung, M.C., Perou, C.M., Lee, A.V., Fang, X., Mills, G.B., 2009. Expression of autotaxin and lysophosphatidic acid receptors increases mammary tumorigenesis, invasion, and metastases. *Cancer cell* 15, 539-550.
- Lu, L., Li, Y., Kim, S.M., Bossuyt, W., Liu, P., Qiu, Q., Wang, Y., Halder, G., Finegold, M.J., Lee, J.S., Johnson, R.L., 2010. Hippo signaling is a potent in vivo growth and tumor suppressor pathway in the mammalian liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 1437-1442.
- Lumsden, A., Keynes, R., 1989. Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain. *Nature* 337, 424-428.
- Lumsden, A., Sprawson, N., Graham, A., 1991. Segmental origin and migration of neural crest cells in the hindbrain region of the chick embryo. *Development (Cambridge, England)* 113, 1281-1291.
- Luo, T., Lee, Y.H., Saint-Jeannet, J.P., Sargent, T.D., 2003. Induction of neural crest in *Xenopus* by transcription factor AP2alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 532-537.
- Luo, T., Matsuo-Takasaki, M., Lim, J.H., Sargent, T.D., 2001. Differential regulation of *Dlx* gene expression by a BMP morphogenetic gradient. *The International journal of developmental biology* 45, 681-684.
- Ma, Q., Kintner, C., Anderson, D.J., 1996. Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell* 87, 43-52.

- MacLellan, W.R., Lee, T.C., Schwartz, R.J., Schneider, M.D., 1994. Transforming growth factor-beta response elements of the skeletal alpha-actin gene. Combinatorial action of serum response factor, YY1, and the SV40 enhancer-binding protein, TEF-1. *The Journal of biological chemistry* 269, 16754-16760.
- Maden, M., 2001. Role and distribution of retinoic acid during CNS development. *International review of cytology* 209, 1-77.
- Madiha, M., Khaled, K., 2015. [Waardenburg syndrome]. *The Pan African medical journal* 20, 427.
- Maeda, T., Chapman, D.L., Stewart, A.F., 2002a. Mammalian vestigial-like 2, a cofactor of TEF-1 and MEF2 transcription factors that promotes skeletal muscle differentiation. *The Journal of biological chemistry* 277, 48889-48898.
- Maeda, T., Gupta, M.P., Stewart, A.F., 2002b. TEF-1 and MEF2 transcription factors interact to regulate muscle-specific promoters. *Biochemical and biophysical research communications* 294, 791-797.
- Maeda, T., Maeda, M., Stewart, A.F., 2002c. TEF-1 transcription factors regulate activity of the mouse mammary tumor virus LTR. *Biochemical and biophysical research communications* 296, 1279-1285.
- Maeda, T., Mazzulli, J.R., Farrance, I.K., Stewart, A.F., 2002d. Mouse DTEF-1 (ETFR-1, TEF-5) is a transcriptional activator in alpha 1-adrenergic agonist-stimulated cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* 277, 24346-24352.
- Magico, A.C., Bell, J.B., 2011. Identification of a classical bipartite nuclear localization signal in the Drosophila TEA/ATTS protein scalloped. *PloS one* 6, e21431.
- Mahoney, P.A., Weber, U., Onofrechuk, P., Biessmann, H., Bryant, P.J., Goodman, C.S., 1991. The fat tumor suppressor gene in Drosophila encodes a novel member of the cadherin gene superfamily. *Cell* 67, 853-868.
- Mahoney, W.M., Jr., Hong, J.H., Yaffe, M.B., Farrance, I.K., 2005. The transcriptional co-activator TAZ interacts differentially with transcriptional enhancer factor-1 (TEF-1) family members. *The Biochemical journal* 388, 217-225.
- Makita, R., Uchijima, Y., Nishiyama, K., Amano, T., Chen, Q., Takeuchi, T., Mitani, A., Nagase, T., Yatomi, Y., Aburatani, H., Nakagawa, O., Small, E.V., Cobo-Stark, P., Igarashi, P., Murakami, M., Tominaga, J., Sato, T., Asano, T., Kurihara, Y., Kurihara, H., 2008. Multiple renal cysts, urinary concentration defects, and pulmonary emphysematous changes in mice lacking TAZ. *American journal of physiology. Renal physiology* 294, F542-553.
- Mancilla, A., Mayor, R., 1996. Neural crest formation in *Xenopus laevis*: mechanisms of Xslug induction. *Developmental biology* 177, 580-589.
- Manderfield, L.J., Aghajanian, H., Engleka, K.A., Lim, L.Y., Liu, F., Jain, R., Li, L., Olson, E.N., Epstein, J.A., 2015. Hippo signaling is required for Notch-dependent smooth muscle differentiation of neural crest. *Development (Cambridge, England)* 142, 2962-2971.
- Mann, C.J., Osborn, D.P., Hughes, S.M., 2007. Vestigial-like-2b (VITO-1b) and Tead-3a (Tef-5a) expression in zebrafish skeletal muscle, brain and notochord. *Gene expression patterns : GEP* 7, 827-836.
- Mann, K.M., Ward, J.M., Yew, C.C., Kovochich, A., Dawson, D.W., Black, M.A., Brett, B.T., Sheetz, T.E., Dupuy, A.J., Chang, D.K., Biankin, A.V., Waddell, N., Kassahn, K.S., Grimmond, S.M., Rust, A.G., Adams, D.J., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., 2012. Sleeping Beauty mutagenesis reveals cooperating mutations and pathways in pancreatic adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 5934-5941.
- Mann, R.S., Carroll, S.B., 2002. Molecular mechanisms of selector gene function and evolution. *Current opinion in genetics & development* 12, 592-600.
- Mar, J.H., Ordahl, C.P., 1988. A conserved CATTCT motif is required for skeletal muscle-specific activity of the cardiac troponin T gene promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 6404-6408.

- Marchant, L., Linker, C., Ruiz, P., Guerrero, N., Mayor, R., 1998. The inductive properties of mesoderm suggest that the neural crest cells are specified by a BMP gradient. *Developmental biology* 198, 319-329.
- Mark, M., Rijli, F.M., Chambon, P., 1997. Homeobox genes in embryogenesis and pathogenesis. *Pediatric research* 42, 421-429.
- Matakatsu, H., Blair, S.S., 2004. Interactions between Fat and Dachshous and the regulation of planar cell polarity in the *Drosophila* wing. *Development (Cambridge, England)* 131, 3785-3794.
- Mayor, R., Carmona-Fontaine, C., 2010. Keeping in touch with contact inhibition of locomotion. *Trends in cell biology* 20, 319-328.
- Mayor, R., Guerrero, N., Martinez, C., 1997. Role of FGF and noggin in neural crest induction. *Developmental biology* 189, 1-12.
- Mayor, R., Morgan, R., Sargent, M.G., 1995. Induction of the prospective neural crest of *Xenopus*. *Development (Cambridge, England)* 121, 767-777.
- McCartney, B.M., Kulikaukas, R.M., LaJeunesse, D.R., Fehon, R.G., 2000. The neurofibromatosis-2 homologue, Merlin, and the tumor suppressor expanded function together in *Drosophila* to regulate cell proliferation and differentiation. *Development (Cambridge, England)* 127, 1315-1324.
- McCusker, C., Cousin, H., Neuner, R., Alfandari, D., 2009. Extracellular cleavage of cadherin-11 by ADAM metalloproteases is essential for *Xenopus* cranial neural crest cell migration. *Molecular biology of the cell* 20, 78-89.
- McKeown, S.J., Lee, V.M., Bronner-Fraser, M., Newgreen, D.F., Farlie, P.G., 2005. Sox10 overexpression induces neural crest-like cells from all dorsoventral levels of the neural tube but inhibits differentiation. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 233, 430-444.
- McPherson, J.P., Tamblyn, L., Elia, A., Migon, E., Shehabeldin, A., Matysiak-Zablocki, E., Lemmers, B., Salmena, L., Hakem, A., Fish, J., Kassam, F., Squire, J., Bruneau, B.G., Hande, M.P., Hakem, R., 2004. Lats2/Kpm is required for embryonic development, proliferation control and genomic integrity. *The EMBO journal* 23, 3677-3688.
- Mellott, D.O., Burke, R.D., 2008. Divergent roles for Eph and ephrin in avian cranial neural crest. *BMC developmental biology* 8, 56.
- Melvin, V.S., Feng, W., Hernandez-Lagunas, L., Artinger, K.B., Williams, T., 2013. A morpholino-based screen to identify novel genes involved in craniofacial morphogenesis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 242, 817-831.
- Metaye, T., Gibelin, H., Perdrisot, R., Kraimps, J.L., 2005. Pathophysiological roles of G-protein-coupled receptor kinases. *Cellular signalling* 17, 917-928.
- Meulemans, D., Bronner-Fraser, M., 2004. Gene-regulatory interactions in neural crest evolution and development. *Developmental cell* 7, 291-299.
- Meyer, D., Durliat, M., Senan, F., Wolff, M., Andre, M., Houdry, J., Remy, P., 1997. Ets-1 and Ets-2 proto-oncogenes exhibit differential and restricted expression patterns during *Xenopus laevis* oogenesis and embryogenesis. *The International journal of developmental biology* 41, 607-620.
- Mielcarek, M., Gunther, S., Kruger, M., Braun, T., 2002a. VITO-1, a novel vestigial related protein is predominantly expressed in the skeletal muscle lineage. *Gene expression patterns : GEP* 2, 305-310.
- Mielcarek, M., Gunther, S., Kruger, M., Braun, T., 2002b. VITO-1, a novel vestigial related protein is predominantly expressed in the skeletal muscle lineage. *Mech Dev* 119 Suppl 1, S269-274.
- Mielcarek, M., Piotrowska, I., Schneider, A., Gunther, S., Braun, T., 2009. VITO-2, a new SID domain protein, is expressed in the myogenic lineage during early mouse embryonic development. *Gene expression patterns : GEP* 9, 129-137.

- Milet, C., Maczkowiak, F., Roche, D.D., Monsoro-Burq, A.H., 2013. Pax3 and Zic1 drive induction and differentiation of multipotent, migratory, and functional neural crest in *Xenopus* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 5528-5533.
- Milet, C., Monsoro-Burq, A.H., 2012. Neural crest induction at the neural plate border in vertebrates. *Developmental biology* 366, 22-33.
- Milet, C., Monsoro-Burq, A.H., 2014. Dissection of *Xenopus laevis* neural crest for in vitro explant culture or in vivo transplantation. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- Milewski, R.C., Chi, N.C., Li, J., Brown, C., Lu, M.M., Epstein, J.A., 2004. Identification of minimal enhancer elements sufficient for Pax3 expression in neural crest and implication of Tead2 as a regulator of Pax3. *Development (Cambridge, England)* 131, 829-837.
- Miller, C.T., Swartz, M.E., Khuu, P.A., Walker, M.B., Eberhart, J.K., Kimmel, C.B., 2007. *mef2ca* is required in cranial neural crest to effect Endothelin1 signaling in zebrafish. *Developmental biology* 308, 144-157.
- Miller, E., Yang, J., DeRan, M., Wu, C., Su, A.I., Bonamy, G.M., Liu, J., Peters, E.C., Wu, X., 2012. Identification of serum-derived sphingosine-1-phosphate as a small molecule regulator of YAP. *Chemistry & biology* 19, 955-962.
- Miller, J.R., Rowning, B.A., Larabell, C.A., Yang-Snyder, J.A., Bates, R.L., Moon, R.T., 1999. Establishment of the dorsal-ventral axis in *Xenopus* embryos coincides with the dorsal enrichment of dishevelled that is dependent on cortical rotation. *J Cell Biol* 146, 427-437.
- Miraoui, H., Marie, P.J., 2010. Pivotal role of Twist in skeletal biology and pathology. *Gene* 468, 1-7.
- Mitani, A., Nagase, T., Fukuchi, K., Aburatani, H., Makita, R., Kurihara, H., 2009. Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif is essential for normal alveolarization in mice. *American journal of respiratory and critical care medicine* 180, 326-338.
- Miyata, T., Maeda, T., Lee, J.E., 1999. NeuroD is required for differentiation of the granule cells in the cerebellum and hippocampus. *Genes & development* 13, 1647-1652.
- Mizuseki, K., Kishi, M., Matsui, M., Nakanishi, S., Sasai, Y., 1998. *Xenopus* Zic-related-1 and Sox-2, two factors induced by chordin, have distinct activities in the initiation of neural induction. *Development (Cambridge, England)* 125, 579-587.
- Mo, J.S., Yu, F.X., Gong, R., Brown, J.H., Guan, K.L., 2012. Regulation of the Hippo-YAP pathway by protease-activated receptors (PARs). *Genes & development* 26, 2138-2143.
- Moens, C.B., Prince, V.E., 2002. Constructing the hindbrain: insights from the zebrafish. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 224, 1-17.
- Monsoro-Burq, A.H., Fletcher, R.B., Harland, R.M., 2003. Neural crest induction by paraxial mesoderm in *Xenopus* embryos requires FGF signals. *Development (Cambridge, England)* 130, 3111-3124.
- Monsoro-Burq, A.H., Wang, E., Harland, R., 2005. Msx1 and Pax3 cooperate to mediate FGF8 and WNT signals during *Xenopus* neural crest induction. *Developmental cell* 8, 167-178.
- Morin-Kensicki, E.M., Boone, B.N., Howell, M., Stonebraker, J.R., Teed, J., Alb, J.G., Magnuson, T.R., O'Neal, W., Milgram, S.L., 2006. Defects in yolk sac vasculogenesis, chorioallantoic fusion, and embryonic axis elongation in mice with targeted disruption of Yap65. *Molecular and cellular biology* 26, 77-87.
- Moury, J.D., Jacobson, A.G., 1989. Neural fold formation at newly created boundaries between neural plate and epidermis in the axolotl. *Developmental biology* 133, 44-57.
- Moury, J.D., Jacobson, A.G., 1990. The origins of neural crest cells in the axolotl. *Developmental biology* 141, 243-253.
- Mueller, T., Wullmann, M.F., 2003. Anatomy of neurogenesis in the early zebrafish brain. *Brain research. Developmental brain research* 140, 137-155.
- Murakami, M., Nakagawa, M., Olson, E.N., Nakagawa, O., 2005. A WW domain protein TAZ is a critical coactivator for TBX5, a transcription factor implicated in Holt-Oram syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 18034-18039.

- Murphy, G., 2008. The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. *Nature reviews. Cancer* 8, 929-941.
- Nagatomo, K., Hashimoto, C., 2007. *Xenopus* hairy2 functions in neural crest formation by maintaining cells in a mitotic and undifferentiated state. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 236, 1475-1483.
- Nakagawa, S., Takeichi, M., 1995. Neural crest cell-cell adhesion controlled by sequential and subpopulation-specific expression of novel cadherins. *Development (Cambridge, England)* 121, 1321-1332.
- Nakata, K., Koyabu, Y., Aruga, J., Mikoshiba, K., 2000. A novel member of the *Xenopus* Zic family, Zic5, mediates neural crest development. *Mechanisms of development* 99, 83-91.
- Nakata, K., Nagai, T., Aruga, J., Mikoshiba, K., 1997. *Xenopus* Zic3, a primary regulator both in neural and neural crest development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 11980-11985.
- Nakata, K., Nagai, T., Aruga, J., Mikoshiba, K., 1998. *Xenopus* Zic family and its role in neural and neural crest development. *Mechanisms of development* 75, 43-51.
- Nakaya, N., Lee, H.S., Takada, Y., Tzchori, I., Tomarev, S.I., 2008. Zebrafish olfactomedin 1 regulates retinal axon elongation in vivo and is a modulator of Wnt signaling pathway. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 7900-7910.
- Naye, F., Treguer, K., Soulet, F., Faucheux, C., Fedou, S., Theze, N., Thiebaud, P., 2007. Differential expression of two TEF-1 (TEAD) genes during *Xenopus laevis* development and in response to inducing factors. *The International journal of developmental biology* 51, 745-752.
- Neufeld, G., Kessler, O., 2008. The semaphorins: versatile regulators of tumour progression and tumour angiogenesis. *Nature reviews. Cancer* 8, 632-645.
- Nguyen, V.H., Schmid, B., Trout, J., Connors, S.A., Ekker, M., Mullins, M.C., 1998. Ventral and lateral regions of the zebrafish gastrula, including the neural crest progenitors, are established by a bmp2b/swirl pathway of genes. *Developmental biology* 199, 93-110.
- Nichane, M., de Croze, N., Ren, X., Souopgui, J., Monsoro-Burq, A.H., Bellefroid, E.J., 2008a. Hairy2-Id3 interactions play an essential role in *Xenopus* neural crest progenitor specification. *Developmental biology* 322, 355-367.
- Nichane, M., Ren, X., Souopgui, J., Bellefroid, E.J., 2008b. Hairy2 functions through both DNA-binding and non DNA-binding mechanisms at the neural plate border in *Xenopus*. *Developmental biology* 322, 368-380.
- Nie, S., Kee, Y., Bronner-Fraser, M., 2009. Myosin-X is critical for migratory ability of *Xenopus* cranial neural crest cells. *Developmental biology* 335, 132-142.
- Niehrs, C., 1999. Head in the WNT: the molecular nature of Spemann's head organizer. *Trends in genetics : TIG* 15, 314-319.
- Nieto, M.A., 2009. Epithelial-Mesenchymal Transitions in development and disease: old views and new perspectives. *The International journal of developmental biology* 53, 1541-1547.
- Nieuwkoop, P.D., Faber, J., 1975. Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin), in: Co, E.N.-H.P. (Ed.), 2nd ed. Garland, Amsterdam.
- Niro, C., Demignon, J., Vincent, S., Liu, Y., Giordani, J., Sgarlato, N., Favier, M., Guillet-Deniau, I., Blais, A., Maire, P., 2010. Six1 and Six4 gene expression is necessary to activate the fast-type muscle gene program in the mouse primary myotome. *Developmental biology* 338, 168-182.
- Nishio, M., Hamada, K., Kawahara, K., Sasaki, M., Noguchi, F., Chiba, S., Mizuno, K., Suzuki, S.O., Dong, Y., Tokuda, M., Morikawa, T., Hikasa, H., Eggenschwiler, J., Yabuta, N., Nojima, H., Nakagawa, K., Hata, Y., Nishina, H., Mimori, K., Mori, M., Sasaki, T., Mak, T.W., Nakano, T., Itami, S., Suzuki, A., 2012. Cancer susceptibility and embryonic lethality in Mob1a/1b double-mutant mice. *The Journal of clinical investigation* 122, 4505-4518.

- Nishioka, N., Yamamoto, S., Kiyonari, H., Sato, H., Sawada, A., Ota, M., Nakao, K., Sasaki, H., 2008. Tead4 is required for specification of trophectoderm in pre-implantation mouse embryos. *Mechanisms of development* 125, 270-283.
- Noden, D.M., 1991. Vertebrate craniofacial development: the relation between ontogenetic process and morphological outcome. *Brain Behav Evol* 38, 190-225.
- Noden, D.M., Francis-West, P., 2006. The differentiation and morphogenesis of craniofacial muscles. *Developmental dynamics* : an official publication of the American Association of Anatomists 235, 1194-1218.
- Noden, D.M., Trainor, P.A., 2005. Relations and interactions between cranial mesoderm and neural crest populations. *J Anat* 207, 575-601.
- Nonchev, S., Vesque, C., Maconochie, M., Seitanidou, T., Ariza-McNaughton, L., Frain, M., Marshall, H., Sham, M.H., Krumlauf, R., Charnay, P., 1996. Segmental expression of Hoxa-2 in the hindbrain is directly regulated by Krox-20. *Development (Cambridge, England)* 122, 543-554.
- Nordstrom, U., Jessell, T.M., Edlund, T., 2002. Progressive induction of caudal neural character by graded Wnt signaling. *Nature neuroscience* 5, 525-532.
- Nottebohm, F., 2002. Neuronal replacement in adult brain. *Brain research bulletin* 57, 737-749.
- O'Donnell, M., Hong, C.S., Huang, X., Delnicki, R.J., Saint-Jeannet, J.P., 2006. Functional analysis of Sox8 during neural crest development in *Xenopus*. *Development (Cambridge, England)* 133, 3817-3826.
- Overall, C.M., Kleinfeld, O., 2006. Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nature reviews. Cancer* 6, 227-239.
- Overholtzer, M., Zhang, J., Smolen, G.A., Muir, B., Li, W., Sgroi, D.C., Deng, C.X., Brugge, J.S., Haber, D.A., 2006. Transforming properties of YAP, a candidate oncogene on the chromosome 11q22 amplicon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 12405-12410.
- Page-McCaw, A., Ewald, A.J., Werb, Z., 2007. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8, 221-233.
- Pan, D., 2007. Hippo signaling in organ size control. *Genes & development* 21, 886-897.
- Panopoulou, G., Hennig, S., Groth, D., Krause, A., Poustka, A.J., Herwig, R., Vingron, M., Lehrach, H., 2003. New evidence for genome-wide duplications at the origin of vertebrates using an amphioxus gene set and completed animal genomes. *Genome research* 13, 1056-1066.
- Pantalacci, S., Tapon, N., Leopold, P., 2003. The Salvador partner Hippo promotes apoptosis and cell-cycle exit in *Drosophila*. *Nature cell biology* 5, 921-927.
- Papalopulu, N., Clarke, J.D., Bradley, L., Wilkinson, D., Krumlauf, R., Holder, N., 1991. Retinoic acid causes abnormal development and segmental patterning of the anterior hindbrain in *Xenopus* embryos. *Development (Cambridge, England)* 113, 1145-1158.
- Parisi, M.A., Kapur, R.P., 2000. Genetics of Hirschsprung disease. *Current opinion in pediatrics* 12, 610-617.
- Pasqualetti, M., Ori, M., Nardi, I., Rijli, F.M., 2000. Ectopic Hoxa2 induction after neural crest migration results in homeosis of jaw elements in *Xenopus*. *Development (Cambridge, England)* 127, 5367-5378.
- Pasquet, S., Naye, F., Faucheux, C., Bronchain, O., Chesneau, A., Thiebaud, P., Theze, N., 2006. Transcription enhancer factor-1-dependent expression of the alpha-tropomyosin gene in the three muscle cell types. *The Journal of biological chemistry* 281, 34406-34420.
- Paumard-Rigal, S., Zider, A., Vaudin, P., Silber, J., 1998. Specific interactions between vestigial and scalloped are required to promote wing tissue proliferation in *Drosophila melanogaster*. *Development genes and evolution* 208, 440-446.
- Peng, Z., Skoog, L., Hellborg, H., Jonstam, G., Wingmo, I.L., Hjalmar-Eriksson, M., Harmenberg, U., Cedermark, G.C., Andersson, K., Ahrlund-Richter, L., Pramana, S., Pawitan, Y.,

- Nister, M., Nilsson, S., Li, C., 2014. An expression signature at diagnosis to estimate prostate cancer patients' overall survival. *Prostate cancer and prostatic diseases* 17, 81-90.
- Pera, E.M., Ikeda, A., Eivers, E., De Robertis, E.M., 2003. Integration of IGF, FGF, and anti-BMP signals via Smad1 phosphorylation in neural induction. *Genes & development* 17, 3023-3028.
- Plouhinec, J.L., Roche, D.D., Pegoraro, C., Figueiredo, A.L., Maczkowiak, F., Brunet, L.J., Milet, C., Vert, J.P., Pollet, N., Harland, R.M., Monsoro-Burq, A.H., 2014. Pax3 and Zic1 trigger the early neural crest gene regulatory network by the direct activation of multiple key neural crest specifiers. *Developmental biology* 386, 461-472.
- Pobbati, A.V., Chan, S.W., Lee, I., Song, H., Hong, W., 2012. Structural and functional similarity between the Vgll1-TEAD and the YAP-TEAD complexes. *Structure (London, England : 1993)* 20, 1135-1140.
- Pobbati, A.V., Hong, W., 2013. Emerging roles of TEAD transcription factors and its coactivators in cancers. *Cancer biology & therapy* 14, 390-398.
- Potthoff, M.J., Olson, E.N., 2007. MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Development (Cambridge, England)* 134, 4131-4140.
- Pozzoli, O., Bosetti, A., Croci, L., Consalez, G.G., Vetter, M.L., 2001. Xebf3 is a regulator of neuronal differentiation during primary neurogenesis in *Xenopus*. *Developmental biology* 233, 495-512.
- Prasad, M.S., Sauka-Spengler, T., LaBonne, C., 2012. Induction of the neural crest state: control of stem cell attributes by gene regulatory, post-transcriptional and epigenetic interactions. *Dev Biol* 366, 10-21.
- Praskova, M., Khoklatchev, A., Ortiz-Vega, S., Avruch, J., 2004. Regulation of the MST1 kinase by autophosphorylation, by the growth inhibitory proteins, RASSF1 and NORE1, and by Ras. *The Biochemical journal* 381, 453-462.
- Praskova, M., Xia, F., Avruch, J., 2008. MOBKL1A/MOBKL1B phosphorylation by MST1 and MST2 inhibits cell proliferation. *Current biology : CB* 18, 311-321.
- Provenzano, P.P., Keely, P.J., 2011. Mechanical signaling through the cytoskeleton regulates cell proliferation by coordinated focal adhesion and Rho GTPase signaling. *Journal of cell science* 124, 1195-1205.
- Qin, H., Blaschke, K., Wei, G., Ohi, Y., Blouin, L., Qi, Z., Yu, J., Yeh, R.F., Hebrok, M., Ramalho-Santos, M., 2012. Transcriptional analysis of pluripotency reveals the Hippo pathway as a barrier to reprogramming. *Human molecular genetics* 21, 2054-2067.
- Ragland, J.W., Raible, D.W., 2004. Signals derived from the underlying mesoderm are dispensable for zebrafish neural crest induction. *Developmental biology* 276, 16-30.
- Ramalho-Santos, M., Yoon, S., Matsuzaki, Y., Mulligan, R.C., Melton, D.A., 2002. "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science (New York, N.Y.)* 298, 597-600.
- Rangarajan, J., Luo, T., Sargent, T.D., 2006. PCNS: a novel protocadherin required for cranial neural crest migration and somite morphogenesis in *Xenopus*. *Developmental biology* 295, 206-218.
- Rauskolb, C., Pan, G., Reddy, B.V., Oh, H., Irvine, K.D., 2011. Zyxin links fat signaling to the hippo pathway. *PLoS biology* 9, e1000624.
- Ren, F., Wang, B., Yue, T., Yun, E.Y., Ip, Y.T., Jiang, J., 2010. Hippo signaling regulates *Drosophila* intestine stem cell proliferation through multiple pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 21064-21069.
- Richardson, A.L., Wang, Z.C., De Nicolo, A., Lu, X., Brown, M., Miron, A., Liao, X., Iglehart, J.D., Livingston, D.M., Ganesan, S., 2006. X chromosomal abnormalities in basal-like human breast cancer. *Cancer cell* 9, 121-132.
- Robinson, B.S., Huang, J., Hong, Y., Moberg, K.H., 2010. Crumbs regulates Salvador/Warts/Hippo signaling in *Drosophila* via the FERM-domain protein Expanded. *Current biology : CB* 20, 582-590.

- Roelink, H., Augsburger, A., Heemskerk, J., Korzh, V., Norlin, S., Ruiz i Altaba, A., Tanabe, Y., Placzek, M., Edlund, T., Jessell, T.M., et al., 1994. Floor plate and motor neuron induction by vhh-1, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the notochord. *Cell* 76, 761-775.
- Rogulja, D., Rauskolb, C., Irvine, K.D., 2008. Morphogen control of wing growth through the Fat signaling pathway. *Developmental cell* 15, 309-321.
- Rorth, P., 2009. Collective cell migration. *Annual review of cell and developmental biology* 25, 407-429.
- Rosenfeld, J.A., Amrom, D., Andermann, E., Andermann, F., Veilleux, M., Curry, C., Fisher, J., Deputy, S., Aylsworth, A.S., Powell, C.M., Manickam, K., Heese, B., Maisenbacher, M., Stevens, C., Ellison, J.W., Upton, S., Moeschler, J., Torres-Martinez, W., Stevens, A., Marion, R., Pereira, E.M., Babcock, M., Morrow, B., Sahoo, T., Lamb, A.N., Ballif, B.C., Paciorkowski, A.R., Shaffer, L.G., 2012. Genotype-phenotype correlation in interstitial 6q deletions: a report of 12 new cases. *Neurogenetics* 13, 31-47.
- Roybon, L., Deierborg, T., Brundin, P., Li, J.Y., 2009a. Involvement of Ngn2, Tbr and NeuroD proteins during postnatal olfactory bulb neurogenesis. *The European journal of neuroscience* 29, 232-243.
- Roybon, L., Hjalt, T., Stott, S., Guillemot, F., Li, J.Y., Brundin, P., 2009b. Neurogenin2 directs granule neuroblast production and amplification while NeuroD1 specifies neuronal fate during hippocampal neurogenesis. *PLoS one* 4, e4779.
- Ruiz i Altaba, A., Jessell, T., 1991. Retinoic acid modifies mesodermal patterning in early *Xenopus* embryos. *Genes & development* 5, 175-187.
- Sahai, E., Marshall, C.J., 2002. RHO-GTPases and cancer. *Nature reviews. Cancer* 2, 133-142.
- Saint-Jeannet, J.P., Moody, S.A., 2014. Establishing the pre-placodal region and breaking it into placodes with distinct identities. *Developmental biology* 389, 13-27.
- Salichs, E., Ledda, A., Mularoni, L., Alba, M.M., de la Luna, S., 2009. Genome-wide analysis of histidine repeats reveals their role in the localization of human proteins to the nuclear speckles compartment. *PLoS genetics* 5, e1000397.
- Sansores-Garcia, L., Bossuyt, W., Wada, K., Yonemura, S., Tao, C., Sasaki, H., Halder, G., 2011. Modulating F-actin organization induces organ growth by affecting the Hippo pathway. *The EMBO journal* 30, 2325-2335.
- Santiago, A., Erickson, C.A., 2002. Ephrin-B ligands play a dual role in the control of neural crest cell migration. *Development (Cambridge, England)* 129, 3621-3632.
- Sasai, N., Mizuseki, K., Sasai, Y., 2001. Requirement of FoxD3-class signaling for neural crest determination in *Xenopus*. *Development (Cambridge, England)* 128, 2525-2536.
- Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H., Geissert, D., Gont, L.K., De Robertis, E.M., 1994. *Xenopus* chordin: a novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes. *Cell* 79, 779-790.
- Sato, T., Sasai, N., Sasai, Y., 2005. Neural crest determination by co-activation of Pax3 and Zic1 genes in *Xenopus* ectoderm. *Development (Cambridge, England)* 132, 2355-2363.
- Saucedo, L.J., Edgar, B.A., 2007. Filling out the Hippo pathway. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8, 613-621.
- Sawada, A., Kiyonari, H., Ukita, K., Nishioka, N., Imuta, Y., Sasaki, H., 2008. Redundant roles of Tead1 and Tead2 in notochord development and the regulation of cell proliferation and survival. *Molecular and cellular biology* 28, 3177-3189.
- Scardigli, R., Schuurmans, C., Gradwohl, G., Guillemot, F., 2001. Crossregulation between Neurogenin2 and pathways specifying neuronal identity in the spinal cord. *Neuron* 31, 203-217.
- Schilling, T.F., Prince, V., Ingham, P.W., 2001. Plasticity in zebrafish hox expression in the hindbrain and cranial neural crest. *Developmental biology* 231, 201-216.
- Schlegelmilch, K., Mohseni, M., Kirak, O., Pruszk, J., Rodriguez, J.R., Zhou, D., Kreger, B.T., Vasioukhin, V., Avruch, J., Brummelkamp, T.R., Camargo, F.D., 2011. Yap1 acts downstream of alpha-catenin to control epidermal proliferation. *Cell* 144, 782-795.

- Schlosser, G., 2003. Hypobranchial placodes in *Xenopus laevis* give rise to hypobranchial ganglia, a novel type of cranial ganglia. *Cell and tissue research* 312, 21-29.
- Schlosser, G., 2006. Induction and specification of cranial placodes. *Developmental biology* 294, 303-351.
- Schlosser, G., Ahrens, K., 2004. Molecular anatomy of placode development in *Xenopus laevis*. *Developmental biology* 271, 439-466.
- Schlosser, G., Koyano-Nakagawa, N., Kintner, C., 2002. Thyroid hormone promotes neurogenesis in the *Xenopus* spinal cord. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 225, 485-498.
- Schlosser, G., Northcutt, R.G., 2000. Development of neurogenic placodes in *Xenopus laevis*. *The Journal of comparative neurology* 418, 121-146.
- Schneider-Maunoury, S., Topilko, P., Seitandou, T., Levi, G., Cohen-Tannoudji, M., Pournin, S., Babinet, C., Charnay, P., 1993. Disruption of *Krox-20* results in alteration of rhombomeres 3 and 5 in the developing hindbrain. *Cell* 75, 1199-1214.
- Sebe-Pedros, A., Zheng, Y., Ruiz-Trillo, I., Pan, D., 2012. Premetazoan origin of the hippo signaling pathway. *Cell reports* 1, 13-20.
- Sechrist, J., Serbedzija, G.N., Scherson, T., Fraser, S.E., Bronner-Fraser, M., 1993. Segmental migration of the hindbrain neural crest does not arise from its segmental generation. *Development (Cambridge, England)* 118, 691-703.
- Selleck, M.A., Bronner-Fraser, M., 1995. Origins of the avian neural crest: the role of neural plate-epidermal interactions. *Development (Cambridge, England)* 121, 525-538.
- Sementchenko, V.I., Watson, D.K., 2000. Ets target genes: past, present and future. *Oncogene* 19, 6533-6548.
- Seo, S., Richardson, G.A., Kroll, K.L., 2005. The SWI/SNF chromatin remodeling protein Brg1 is required for vertebrate neurogenesis and mediates transactivation of *Ngn* and *NeuroD*. *Development* 132, 105-115.
- Serbedzija, G.N., Bronner-Fraser, M., Fraser, S.E., 1992. Vital dye analysis of cranial neural crest cell migration in the mouse embryo. *Development (Cambridge, England)* 116, 297-307.
- Seth, A., Watson, D.K., 2005. ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 41, 2462-2478.
- Sharrocks, A.D., 2001. The ETS-domain transcription factor family. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2, 827-837.
- Shaw, R.L., Kohlmaier, A., Polesello, C., Veelken, C., Edgar, B.A., Tapon, N., 2010. The Hippo pathway regulates intestinal stem cell proliferation during *Drosophila* adult midgut regeneration. *Development (Cambridge, England)* 137, 4147-4158.
- Shimizu, N., Smith, G., Izumo, S., 1993. Both a ubiquitous factor mTEF-1 and a distinct muscle-specific factor bind to the M-CAT motif of the myosin heavy chain beta gene. *Nucleic acids research* 21, 4103-4110.
- Shoval, I., Ludwig, A., Kalcheim, C., 2007. Antagonistic roles of full-length N-cadherin and its soluble BMP cleavage product in neural crest delamination. *Development (Cambridge, England)* 134, 491-501.
- Silva, E., Tsatskis, Y., Gardano, L., Tapon, N., McNeill, H., 2006. The tumor-suppressor gene *fat* controls tissue growth upstream of expanded in the hippo signaling pathway. *Current biology : CB* 16, 2081-2089.
- Silvis, M.R., Kreger, B.T., Lien, W.H., Klezovitch, O., Rudakova, G.M., Camargo, F.D., Lantz, D.M., Seykora, J.T., Vasioukhin, V., 2011. α -catenin is a tumor suppressor that controls cell accumulation by regulating the localization and activity of the transcriptional coactivator Yap1. *Science signaling* 4, ra33.
- Simmonds, A.J., Liu, X., Soanes, K.H., Krause, H.M., Irvine, K.D., Bell, J.B., 1998. Molecular interactions between *Vestigial* and *Scalloped* promote wing formation in *Drosophila*. *Genes & development* 12, 3815-3820.
- Simon, E., Faucheux, C., Zider, A., Thézé, N., Thiébaud, P., From *Vestigial* to *Vestigial-like*: the *Drosophila* that has taken wing. Submitted.

- Simons, M., Mlodzik, M., 2008. Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease. *Annual review of genetics* 42, 517-540.
- Sive, H.L., Grainger, R.M., Harland, R.M., 2000. *Early Development of Xenopus laevis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Slack, J.M., Isaacs, H.V., Song, J., Durbin, L., Pownall, M.E., 1996. The role of fibroblast growth factors in early *Xenopus* development. *Biochemical Society symposium* 62, 1-12.
- Smith, A., Robinson, V., Patel, K., Wilkinson, D.G., 1997. The EphA4 and EphB1 receptor tyrosine kinases and ephrin-B2 ligand regulate targeted migration of branchial neural crest cells. *Current biology : CB* 7, 561-570.
- Song, H., Mak, K.K., Topol, L., Yun, K., Hu, J., Garrett, L., Chen, Y., Park, O., Chang, J., Simpson, R.M., Wang, C.Y., Gao, B., Jiang, J., Yang, Y., 2010. Mammalian Mst1 and Mst2 kinases play essential roles in organ size control and tumor suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 1431-1436.
- Soo, K., O'Rourke, M.P., Khoo, P.L., Steiner, K.A., Wong, N., Behringer, R.R., Tam, P.P., 2002. Twist function is required for the morphogenesis of the cephalic neural tube and the differentiation of the cranial neural crest cells in the mouse embryo. *Developmental biology* 247, 251-270.
- Sorger, P.K., Dobles, M., Tournebize, R., Hyman, A.A., 1997. Coupling cell division and cell death to microtubule dynamics. *Current opinion in cell biology* 9, 807-814.
- Sparrow, D.B., Latinkic, B., Mohun, T.J., 2000. A simplified method of generating transgenic *Xenopus*. *Nucleic acids research* 28, E12.
- Spokony, R.F., Aoki, Y., Saint-Germain, N., Magner-Fink, E., Saint-Jeannet, J.P., 2002. The transcription factor Sox9 is required for cranial neural crest development in *Xenopus*. *Development (Cambridge, England)* 129, 421-432.
- Srivastava, A., Heise, C., Garg, A., Bell, J.B., 2002. The relationship between the dominant Additional vein mutant in *Drosophila melanogaster* and engrailed. *Genome / National Research Council Canada = Genome / Conseil national de recherches Canada* 45, 1077-1082.
- St John, M.A., Tao, W., Fei, X., Fukumoto, R., Carcangiu, M.L., Brownstein, D.G., Parlow, A.F., McGrath, J., Xu, T., 1999. Mice deficient of Lats1 develop soft-tissue sarcomas, ovarian tumours and pituitary dysfunction. *Nature genetics* 21, 182-186.
- Staley, B.K., Irvine, K.D., 2010. Warts and Yorkie mediate intestinal regeneration by influencing stem cell proliferation. *Current biology : CB* 20, 1580-1587.
- Stanojevic, D., Small, S., Levine, M., 1991. Regulation of a segmentation stripe by overlapping activators and repressors in the *Drosophila* embryo. *Science (New York, N.Y.)* 254, 1385-1387.
- Stark, M.R., Sechrist, J., Bronner-Fraser, M., Marcelle, C., 1997. Neural tube-ectoderm interactions are required for trigeminal placode formation. *Development (Cambridge, England)* 124, 4287-4295.
- Steinhardt, A.A., Gayyed, M.F., Klein, A.P., Dong, J., Maitra, A., Pan, D., Montgomery, E.A., Anders, R.A., 2008. Expression of Yes-associated protein in common solid tumors. *Human pathology* 39, 1582-1589.
- Steventon, B., Araya, C., Linker, C., Kuriyama, S., Mayor, R., 2009. Differential requirements of BMP and Wnt signalling during gastrulation and neurulation define two steps in neural crest induction. *Development (Cambridge, England)* 136, 771-779.
- Stewart, A.F., Larkin, S.B., Farrance, I.K., Mar, J.H., Hall, D.E., Ordahl, C.P., 1994. Muscle-enriched TEF-1 isoforms bind M-CAT elements from muscle-specific promoters and differentially activate transcription. *The Journal of biological chemistry* 269, 3147-3150.
- Stewart, A.F., Richard, C.W., 3rd, Suzow, J., Stephan, D., Weremowicz, S., Morton, C.C., Adra, C.N., 1996. Cloning of human RTEF-1, a transcriptional enhancer factor-1-related gene preferentially expressed in skeletal muscle: evidence for an ancient multigene family. *Genomics* 37, 68-76.

- Stewart, R.A., Arduini, B.L., Berghmans, S., George, R.E., Kanki, J.P., Henion, P.D., Look, A.T., 2006. Zebrafish *foxd3* is selectively required for neural crest specification, migration and survival. *Developmental biology* 292, 174-188.
- Strano, S., Munarriz, E., Rossi, M., Castagnoli, L., Shaul, Y., Sacchi, A., Oren, M., Sudol, M., Cesareni, G., Blandino, G., 2001. Physical interaction with Yes-associated protein enhances p73 transcriptional activity. *The Journal of biological chemistry* 276, 15164-15173.
- Streit, A., Berliner, A.J., Papanayotou, C., Sirulnik, A., Stern, C.D., 2000. Initiation of neural induction by FGF signalling before gastrulation. *Nature* 406, 74-78.
- Stumpo, D.J., Byrd, N.A., Phillips, R.S., Ghosh, S., Maronpot, R.R., Castranio, T., Meyers, E.N., Mishina, Y., Blackshear, P.J., 2004. Chorioallantoic fusion defects and embryonic lethality resulting from disruption of *Zfp36L1*, a gene encoding a CCHC tandem zinc finger protein of the Tristetraprolin family. *Molecular and cellular biology* 24, 6445-6455.
- Sudarsan, V., Anant, S., Guptan, P., VijayRaghavan, K., Skaer, H., 2001. Myoblast diversification and ectodermal signaling in *Drosophila*. *Developmental cell* 1, 829-839.
- Sudol, M., Bork, P., Einbond, A., Kastury, K., Druck, T., Negrini, M., Huebner, K., Lehman, D., 1995a. Characterization of the mammalian YAP (Yes-associated protein) gene and its role in defining a novel protein module, the WW domain. *The Journal of biological chemistry* 270, 14733-14741.
- Sudol, M., Chen, H.I., Bougeret, C., Einbond, A., Bork, P., 1995b. Characterization of a novel protein-binding module--the WW domain. *FEBS letters* 369, 67-71.
- Sun, G., Irvine, K.D., 2011. Regulation of Hippo signaling by Jun kinase signaling during compensatory cell proliferation and regeneration, and in neoplastic tumors. *Developmental biology* 350, 139-151.
- Suzuki, A., Ueno, N., Hemmati-Brivanlou, A., 1997. *Xenopus msx1* mediates epidermal induction and neural inhibition by BMP4. *Development (Cambridge, England)* 124, 3037-3044.
- Swartz, E.A., Johnson, A.D., Owens, G.K., 1998. Two MCAT elements of the SM alpha-actin promoter function differentially in SM vs. non-SM cells. *The American journal of physiology* 275, C608-618.
- Tagliabracci, V.S., Engel, J.L., Wen, J., Wiley, S.E., Worby, C.A., Kinch, L.N., Xiao, J., Grishin, N.V., Dixon, J.E., 2012. Secreted kinase phosphorylates extracellular proteins that regulate biomineralization. *Science (New York, N.Y.)* 336, 1150-1153.
- Tahtakran, S.A., Selleck, M.A., 2003. Ets-1 expression is associated with cranial neural crest migration and vasculogenesis in the chick embryo. *Gene expression patterns : GEP* 3, 455-458.
- Tajonar, A., Maehr, R., Hu, G., Sneddon, J.B., Rivera-Feliciano, J., Cohen, D.E., Elledge, S.J., Melton, D.A., 2013. Brief report: *VGLL4* is a novel regulator of survival in human embryonic stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 31, 2833-2841.
- Takebayashi, K., Takahashi, S., Yokota, C., Tsuda, H., Nakanishi, S., Asashima, M., Kageyama, R., 1997. Conversion of ectoderm into a neural fate by *ATH-3*, a vertebrate basic helix-loop-helix gene homologous to *Drosophila* proneural gene *atonal*. *The EMBO journal* 16, 384-395.
- Taneyhill, L.A., Coles, E.G., Bronner-Fraser, M., 2007. *Snail2* directly represses *cadherin6B* during epithelial-to-mesenchymal transitions of the neural crest. *Development (Cambridge, England)* 134, 1481-1490.
- Tapon, N., Harvey, K.F., Bell, D.W., Wahrer, D.C., Schiripo, T.A., Haber, D., Hariharan, I.K., 2002. *salvador* Promotes both cell cycle exit and apoptosis in *Drosophila* and is mutated in human cancer cell lines. *Cell* 110, 467-478.
- Taylor, J.S., Braasch, I., Frickey, T., Meyer, A., Van de Peer, Y., 2003. Genome duplication, a trait shared by 22000 species of ray-finned fish. *Genome research* 13, 382-390.
- Tazumi, S., Yabe, S., Uchiyama, H., 2010. Paraxial T-box genes, *Tbx6* and *Tbx1*, are required for cranial chondrogenesis and myogenesis. *Developmental biology* 346, 170-180.

- Tepass, U., Theres, C., Knust, E., 1990. crumbs encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of Drosophila epithelial cells and required for organization of epithelia. *Cell* 61, 787-799.
- Theveneau, E., Duband, J.L., Altabef, M., 2007. Ets-1 confers cranial features on neural crest delamination. *PLoS one* 2, e1142.
- Theveneau, E., Mayor, R., 2011. Can mesenchymal cells undergo collective cell migration? The case of the neural crest. *Cell adhesion & migration* 5, 490-498.
- Theveneau, E., Mayor, R., 2012. Neural crest delamination and migration: from epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration. *Developmental biology* 366, 34-54.
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y., Nieto, M.A., 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871-890.
- Thiery, J.P., Sleeman, J.P., 2006. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature reviews. Molecular cell biology* 7, 131-142.
- Thomsen, G.H., Melton, D.A., 1993. Processed Vg1 protein is an axial mesoderm inducer in *Xenopus*. *Cell* 74, 433-441.
- Tian, W., Yu, J., Tomchick, D.R., Pan, D., Luo, X., 2010. Structural and functional analysis of the YAP-binding domain of human TEAD2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 7293-7298.
- Tien, C.L., Jones, A., Wang, H., Gerigk, M., Nozell, S., Chang, C., 2015. Snail2/Slug cooperates with Polycomb repressive complex 2 (PRC2) to regulate neural crest development. *Development (Cambridge, England)* 142, 722-731.
- Treguer, K., Faucheux, C., Veschambre, P., Fedou, S., Theze, N., Thiebaud, P., 2013. Comparative functional analysis of ZFP36 genes during *Xenopus* development. *PLoS One* 8, e54550.
- Treguer, K., Naye, F., Thiebaud, P., Fedou, S., Soulet, F., Theze, N., Faucheux, C., 2009. Smooth muscle cell differentiation from human bone marrow: variations in cell type specific markers and Id gene expression in a new model of cell culture. *Cell biology international* 33, 621-631.
- Tribulo, C., Aybar, M.J., Nguyen, V.H., Mullins, M.C., Mayor, R., 2003. Regulation of *Msx* genes by a Bmp gradient is essential for neural crest specification. *Development (Cambridge, England)* 130, 6441-6452.
- Tropepe, V., Li, S., Dickinson, A., Gamse, J.T., Sive, H.L., 2006. Identification of a BMP inhibitor-responsive promoter module required for expression of the early neural gene *zic1*. *Developmental biology* 289, 517-529.
- Tsika, R.W., Schramm, C., Simmer, G., Fitzsimons, D.P., Moss, R.L., Ji, J., 2008. Overexpression of TEAD-1 in transgenic mouse striated muscles produces a slower skeletal muscle contractile phenotype. *The Journal of biological chemistry* 283, 36154-36167.
- Turner, D.P., Findlay, V.J., Moussa, O., Watson, D.K., 2007. Defining ETS transcription regulatory networks and their contribution to breast cancer progression. *Journal of cellular biochemistry* 102, 549-559.
- Tyler, D.M., Baker, N.E., 2007. Expanded and fat regulate growth and differentiation in the *Drosophila* eye through multiple signaling pathways. *Developmental biology* 305, 187-201.
- Udan, R.S., Kango-Singh, M., Nolo, R., Tao, C., Halder, G., 2003. Hippo promotes proliferation arrest and apoptosis in the Salvador/Warts pathway. *Nature cell biology* 5, 914-920.
- Vallin, J., Thuret, R., Giacomello, E., Faraldo, M.M., Thiery, J.P., Broders, F., 2001. Cloning and characterization of three *Xenopus* slug promoters reveal direct regulation by Lef/beta-catenin signaling. *The Journal of biological chemistry* 276, 30350-30358.
- Varelas, X., Sakuma, R., Samavarchi-Tehrani, P., Peerani, R., Rao, B.M., Dembowy, J., Yaffe, M.B., Zandstra, P.W., Wrana, J.L., 2008. TAZ controls Smad nucleocytoplasmic shuttling and regulates human embryonic stem-cell self-renewal. *Nature cell biology* 10, 837-848.
- Varelas, X., Samavarchi-Tehrani, P., Narimatsu, M., Weiss, A., Cockburn, K., Larsen, B.G., Rossant, J., Wrana, J.L., 2010. The Crumbs complex couples cell density sensing to

- Hippo-dependent control of the TGF-beta-SMAD pathway. *Developmental cell* 19, 831-844.
- Vassilev, A., Kaneko, K.J., Shu, H., Zhao, Y., DePamphilis, M.L., 2001. TEAD/TEF transcription factors utilize the activation domain of YAP65, a Src/Yes-associated protein localized in the cytoplasm. *Genes & development* 15, 1229-1241.
- Vaudin, P., Delanoue, R., Davidson, I., Silber, J., Zider, A., 1999. TONDU (TDU), a novel human protein related to the product of vestigial (vg) gene of *Drosophila melanogaster* interacts with vertebrate TEF factors and substitutes for Vg function in wing formation. *Development (Cambridge, England)* 126, 4807-4816.
- Verzi, M.P., Agarwal, P., Brown, C., McCulley, D.J., Schwarz, J.J., Black, B.L., 2007. The transcription factor MEF2C is required for craniofacial development. *Developmental cell* 12, 645-652.
- Villanueva, S., Glavic, A., Ruiz, P., Mayor, R., 2002. Posteriorization by FGF, Wnt, and retinoic acid is required for neural crest induction. *Developmental biology* 241, 289-301.
- Visser-Grieve, S., Zhou, Z., She, Y.M., Huang, H., Cyr, T.D., Xu, T., Yang, X., 2011. LATS1 tumor suppressor is a novel actin-binding protein and negative regulator of actin polymerization. *Cell research* 21, 1513-1516.
- Vogel, V., Sheetz, M., 2006. Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nature reviews. Molecular cell biology* 7, 265-275.
- von Gise, A., Lin, Z., Schlegelmilch, K., Honor, L.B., Pan, G.M., Buck, J.N., Ma, Q., Ishiwata, T., Zhou, B., Camargo, F.D., Pu, W.T., 2012. YAP1, the nuclear target of Hippo signaling, stimulates heart growth through cardiomyocyte proliferation but not hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 2394-2399.
- Wada, K., Itoga, K., Okano, T., Yonemura, S., Sasaki, H., 2011. Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Development (Cambridge, England)* 138, 3907-3914.
- Wallerand, H., Robert, G., Pasticier, G., Ravaud, A., Ballanger, P., Reiter, R.E., Ferriere, J.M., 2010. The epithelial-mesenchymal transition-inducing factor TWIST is an attractive target in advanced and/or metastatic bladder and prostate cancers. *Urologic oncology* 28, 473-479.
- Wang, C., Kam, R.K., Shi, W., Xia, Y., Chen, X., Cao, Y., Sun, J., Du, Y., Lu, G., Chen, Z., Chan, W.Y., Chan, S.O., Deng, Y., Zhao, H., 2015. The Proto-oncogene Transcription Factor Ets1 Regulates Neural Crest Development through Histone Deacetylase 1 to Mediate Output of Bone Morphogenetic Protein Signaling. *The Journal of biological chemistry* 290, 21925-21938.
- Wang, H.U., Anderson, D.J., 1997. Eph family transmembrane ligands can mediate repulsive guidance of trunk neural crest migration and motor axon outgrowth. *Neuron* 18, 383-396.
- Wang, W., Huang, J., Chen, J., 2011. Angiomotin-like proteins associate with and negatively regulate YAP1. *The Journal of biological chemistry* 286, 4364-4370.
- Wang, W.Z., Guo, X., Duan, C., Ma, W.J., Zhang, Y.G., Xu, P., Gao, Z.Q., Wang, Z.F., Yan, H., Zhang, Y.F., Yu, Y.X., Chen, J.C., Lammi, M.J., 2009. Comparative analysis of gene expression profiles between the normal human cartilage and the one with endemic osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 17, 83-90.
- Watt, K.I., Judson, R., Medlow, P., Reid, K., Kurth, T.B., Burniston, J.G., Ratkevicius, A., De Bari, C., Wackerhage, H., 2010. Yap is a novel regulator of C2C12 myogenesis. *Biochemical and biophysical research communications* 393, 619-624.
- Wettstein, D.A., Turner, D.L., Kintner, C., 1997. The *Xenopus* homolog of *Drosophila* Suppressor of Hairless mediates Notch signaling during primary neurogenesis. *Development (Cambridge, England)* 124, 693-702.
- Willecke, M., Hamaratoglu, F., Kango-Singh, M., Udan, R., Chen, C.L., Tao, C., Zhang, X., Halder, G., 2006. The fat cadherin acts through the hippo tumor-suppressor pathway to regulate tissue size. *Current biology : CB* 16, 2090-2100.

- Williams, J.A., Atkin, A.L., Bell, J.B., 1990. The functional organization of the vestigial locus in *Drosophila melanogaster*. *Molecular & general genetics : MGG* 221, 8-16.
- Williams, J.A., Bell, J.B., 1988. Molecular organization of the vestigial region in *Drosophila melanogaster*. *The EMBO journal* 7, 1355-1363.
- Williams, J.A., Bell, J.B., Carroll, S.B., 1991. Control of *Drosophila* wing and haltere development by the nuclear vestigial gene product. *Genes & development* 5, 2481-2495.
- Williams, J.A., Paddock, S.W., Carroll, S.B., 1993. Pattern formation in a secondary field: a hierarchy of regulatory genes subdivides the developing *Drosophila* wing disc into discrete subregions. *Development (Cambridge, England)* 117, 571-584.
- Williams, J.A., Paddock, S.W., Vorwerk, K., Carroll, S.B., 1994. Organization of wing formation and induction of a wing-patterning gene at the dorsal/ventral compartment boundary. *Nature* 368, 299-305.
- Wolf, K., Wu, Y.I., Liu, Y., Geiger, J., Tam, E., Overall, C., Stack, M.S., Friedl, P., 2007. Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nature cell biology* 9, 893-904.
- Woo, K., Fraser, S.E., 1998. Specification of the hindbrain fate in the zebrafish. *Developmental biology* 197, 283-296.
- Wu, S., Huang, J., Dong, J., Pan, D., 2003. hippo encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with salvador and warts. *Cell* 114, 445-456.
- Wu, S., Liu, Y., Zheng, Y., Dong, J., Pan, D., 2008. The TEAD/TEF family protein Scalloped mediates transcriptional output of the Hippo growth-regulatory pathway. *Developmental cell* 14, 388-398.
- Wullimann, M.F., Rink, E., Vernier, P., Schlosser, G., 2005. Secondary neurogenesis in the brain of the African clawed frog, *Xenopus laevis*, as revealed by PCNA, Delta-1, Neurogenin-related-1, and NeuroD expression. *The Journal of comparative neurology* 489, 387-402.
- Xiao, J.H., Davidson, I., Matthes, H., Garnier, J.M., Chambon, P., 1991. Cloning, expression, and transcriptional properties of the human enhancer factor TEF-1. *Cell* 65, 551-568.
- Xu, M.Z., Yao, T.J., Lee, N.P., Ng, I.O., Chan, Y.T., Zender, L., Lowe, S.W., Poon, R.T., Luk, J.M., 2009. Yes-associated protein is an independent prognostic marker in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 115, 4576-4585.
- Xu, R.H., Kim, J., Taira, M., Zhan, S., Sredni, D., Kung, H.F., 1995a. A dominant negative bone morphogenetic protein 4 receptor causes neuralization in *Xenopus* ectoderm. *Biochemical and biophysical research communications* 212, 212-219.
- Xu, T., Wang, W., Zhang, S., Stewart, R.A., Yu, W., 1995b. Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila* lats gene encodes a putative protein kinase. *Development (Cambridge, England)* 121, 1053-1063.
- Yabuta, N., Okada, N., Ito, A., Hosomi, T., Nishihara, S., Sasayama, Y., Fujimori, A., Okuzaki, D., Zhao, H., Ikawa, M., Okabe, M., Nojima, H., 2007. Lats2 is an essential mitotic regulator required for the coordination of cell division. *The Journal of biological chemistry* 282, 19259-19271.
- Yagi, R., Kohn, M.J., Karavanova, I., Kaneko, K.J., Vullhorst, D., DePamphilis, M.L., Buonanno, A., 2007. Transcription factor TEAD4 specifies the trophectoderm lineage at the beginning of mammalian development. *Development (Cambridge, England)* 134, 3827-3836.
- Yan, Y.L., Willoughby, J., Liu, D., Crump, J.G., Wilson, C., Miller, C.T., Singer, A., Kimmel, C., Westerfield, M., Postlethwait, J.H., 2005. A pair of Sox: distinct and overlapping functions of zebrafish sox9 co-orthologs in craniofacial and pectoral fin development. *Development (Cambridge, England)* 132, 1069-1083.
- Yang, G., Scherer, S.J., Shell, S.S., Yang, K., Kim, M., Lipkin, M., Kucherlapati, R., Kolodner, R.D., Edelmann, W., 2004. Dominant effects of an Msh6 missense mutation on DNA repair and cancer susceptibility. *Cancer cell* 6, 139-150.

- Yasunami, M., Suzuki, K., Ohkubo, H., 1996. A novel family of TEA domain-containing transcription factors with distinct spatiotemporal expression patterns. *Biochemical and biophysical research communications* 228, 365-370.
- Yockey, C.E., Smith, G., Izumo, S., Shimizu, N., 1996. cDNA cloning and characterization of murine transcriptional enhancer factor-1-related protein 1, a transcription factor that binds to the M-CAT motif. *The Journal of biological chemistry* 271, 3727-3736.
- Yu, F.X., Mo, J.S., Guan, K.L., 2012a. Upstream regulators of the Hippo pathway. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 11, 4097-4098.
- Yu, F.X., Zhao, B., Panupinthu, N., Jewell, J.L., Lian, I., Wang, L.H., Zhao, J., Yuan, H., Tumaneng, K., Li, H., Fu, X.D., Mills, G.B., Guan, K.L., 2012b. Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. *Cell* 150, 780-791.
- Yu, J., Zheng, Y., Dong, J., Klusza, S., Deng, W.M., Pan, D., 2010. Kibra functions as a tumor suppressor protein that regulates Hippo signaling in conjunction with Merlin and Expanded. *Developmental cell* 18, 288-299.
- Zecca, M., Struhl, G., 2010. A feed-forward circuit linking wingless, fat-dachsous signaling, and the warts-hippo pathway to Drosophila wing growth. *PLoS biology* 8, e1000386.
- Zhang, H., Berg, J.S., Li, Z., Wang, Y., Lang, P., Sousa, A.D., Bhaskar, A., Cheney, R.E., Stromblad, S., 2004. Myosin-X provides a motor-based link between integrins and the cytoskeleton. *Nature cell biology* 6, 523-531.
- Zhang, H., Liu, C.Y., Zha, Z.Y., Zhao, B., Yao, J., Zhao, S., Xiong, Y., Lei, Q.Y., Guan, K.L., 2009. TEAD transcription factors mediate the function of TAZ in cell growth and epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of biological chemistry* 284, 13355-13362.
- Zhang, L., Ren, F., Zhang, Q., Chen, Y., Wang, B., Jiang, J., 2008. The TEAD/TEF family of transcription factor Scalloped mediates Hippo signaling in organ size control. *Developmental cell* 14, 377-387.
- Zhang, N., Bai, H., David, K.K., Dong, J., Zheng, Y., Cai, J., Giovannini, M., Liu, P., Anders, R.A., Pan, D., 2010. The Merlin/NF2 tumor suppressor functions through the YAP oncoprotein to regulate tissue homeostasis in mammals. *Developmental cell* 19, 27-38.
- Zhang, W., Gao, Y., Li, P., Shi, Z., Guo, T., Li, F., Han, X., Feng, Y., Zheng, C., Wang, Z., Chen, H., Zhou, Z., Zhang, L., Ji, H., 2014a. VGLL4 functions as a new tumor suppressor in lung cancer by negatively regulating the YAP-TEAD transcriptional complex. *Cell Res* 24, 331-343.
- Zhang, W., Gao, Y., Li, P., Shi, Z., Guo, T., Li, F., Han, X., Feng, Y., Zheng, C., Wang, Z., Li, F., Chen, H., Zhou, Z., Zhang, L., Ji, H., 2014b. VGLL4 functions as a new tumor suppressor in lung cancer by negatively regulating the YAP-TEAD transcriptional complex. *Cell research* 24, 331-343.
- Zhao, B., Li, L., Lu, Q., Wang, L.H., Liu, C.Y., Lei, Q., Guan, K.L., 2011. Angiomotin is a novel Hippo pathway component that inhibits YAP oncoprotein. *Genes & development* 25, 51-63.
- Zhao, B., Li, L., Tumaneng, K., Wang, C.Y., Guan, K.L., 2010. A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(beta-TRCP). *Genes & development* 24, 72-85.
- Zhao, B., Li, L., Wang, L., Wang, C.Y., Yu, J., Guan, K.L., 2012. Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis. *Genes & development* 26, 54-68.
- Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R.S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L., Zheng, P., Ye, K., Chinnaiyan, A., Halder, G., Lai, Z.C., Guan, K.L., 2007. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes & development* 21, 2747-2761.
- Zhao, B., Ye, X., Yu, J., Li, L., Li, W., Li, S., Yu, J., Lin, J.D., Wang, C.Y., Chinnaiyan, A.M., Lai, Z.C., Guan, K.L., 2008a. TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes & development* 22, 1962-1971.

- Zhao, C., Deng, W., Gage, F.H., 2008b. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132, 645-660.
- Zhou, D., Conrad, C., Xia, F., Park, J.S., Payer, B., Yin, Y., Lauwers, G.Y., Thasler, W., Lee, J.T., Avruch, J., Bardeesy, N., 2009. Mst1 and Mst2 maintain hepatocyte quiescence and suppress hepatocellular carcinoma development through inactivation of the Yap1 oncogene. *Cancer cell* 16, 425-438.
- Zhu, X.J., Wang, C.Z., Dai, P.G., Xie, Y., Song, N.N., Liu, Y., Du, Q.S., Mei, L., Ding, Y.Q., Xiong, W.C., 2007. Myosin X regulates netrin receptors and functions in axonal path-finding. *Nature cell biology* 9, 184-192.
- Zider, A., Flagiello, D., Frouin, I., Silber, J., 1996. Vestigial gene expression in *Drosophila melanogaster* is modulated by the dTMP pool. *Molecular & general genetics : MGG* 251, 91-98.
- Zorn, A.M., Barish, G.D., Williams, B.O., Lavender, P., Klymkowsky, M.W., Varmus, H.E., 1999. Regulation of Wnt signaling by Sox proteins: XSox17 alpha/beta and XSox3 physically interact with beta-catenin. *Molecular cell* 4, 487-498.
- Zou, D., Silvius, D., Fritsch, B., Xu, P.X., 2004. Eya1 and Six1 are essential for early steps of sensory neurogenesis in mammalian cranial placodes. *Development (Cambridge, England)* 131, 5561-5572.
- Zuzarte, P.C., Farrance, I.K., Simpson, P.C., Wildeman, A.G., 2000. Tumor cell splice variants of the transcription factor TEF-1 induced by SV40 T-antigen transformation. *Biochimica et biophysica acta* 1517, 82-90.

Annexes

Annexe 1 : Revue soumise à IJDB

From Vestigial to Vestigial-like : the *Drosophila* gene that has taken wing

**EMILIE SIMON^{1, 2}, CORINNE FAUCHEUX^{1, 2}, ALAIN ZIDER³,
NADINE THÉZÉ^{1, 2, #} and PIERRE THIÉBAUD^{1, 2, #, *}**

¹ Univ. Bordeaux, F-33076, Bordeaux, France

² CNRS, UMR 5164, F-33076 Bordeaux, France

³ Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, IJM, UMR 7592 CNRS, F-75205 cedex
13 Paris, France.

Running title: Evolution and function of the *Vestigial-like* gene family

Keywords: Vestigial, Vestigial-like, TEAD, gene expression, Hippo pathway

Abbreviations: Vg: vestigial; VGLL: vestigial-like; TEAD: TEA domain

*Address correspondence to: Dr. Pierre Thiébaud. UMR CNRS 5164, Université Bordeaux, 146 rue Léo Saignat 33076 Bordeaux, France. Tel : + 33-557-579-265. Fax:

+33-557-571-472. e-mail: pierre.thiebaud@u-bordeaux.fr.

Web: <http://www.UMR5164.u-bordeaux2.fr>.

Note: Co-senior authors

Emilie Simon: emsimon@cirid.org

Corinne Faucheux: corinne.faucheux@u-bordeaux.fr

Alain Zider: zider.alain@ijm.univ-paris-diderot.fr

Nadine Thézé: nadine.theze-thiebaud@u-bordeaux.fr

Pierre Thiébaud: pierre.thiebaud@u-bordeaux.fr

Abstract

The members of the *Vestigial-like* gene family have been identified as homologs of the *Drosophila vestigial*, which is essential to wing formation. All members of the family are characterized by the presence of the TONDU domain, a highly conserved sequence that mediates their interaction with the transcription factors of the TEAD family. Mammals possess four *vestigial-like* genes that can be subdivided into two classes, depending on the number of Tondu domains present. Whilst *vestigial* proteins have been studied in great depth in *Drosophila*, we still have sketchy knowledge of the functions of vestigial-like proteins in vertebrates. Recent studies have unveiled unexpected functions for some of these members, and reveals the role they play in the Hippo pathway. Here, we present the current knowledge about *vestigial-like* family gene members and their functions, together with their identification in different taxa.

Introduction

In 1919, Thomas Morgan and Calvin Bridges described a spontaneous mutant *Drosophila* with wings reduced to vestiges (Bridges and Morgan, 1919). Following the discovery of the so-called *vestigial* (*vg*) mutant, a considerable number of alleles of the gene were isolated (Lindsley and Grell, 1968). *Vestigial* was shown to be required for wing development, and this property is strictly dependent on the association of Vg with the product of *scalloped* (*sd*), which belongs to a conserved family of transcriptional factors initially described in mammalian cells and that possesses a TEA/ATSS-DNA binding domain (TEAD) (Andrianopoulos and Timberlake, 1991, Burglin, 1991, Halder *et al.*, 1998, Kim *et al.*, 1996, Xiao *et al.*, 1991). While Vg functions as a transactivator, the protein complex Vg-Sd binds to DNA in a sequence-specific manner through the Sd TEA domain, thus activating specific genes within the regulatory network that control wing development (Halder *et al.*, 1998, Williams *et al.*, 1991). As described by Garcia Bellido, the properties of Vg and Sd classify them as selector genes, whose function is to govern the fates of groups of cells within embryos (Garcia-Bellido, 1975, Mann and Carroll, 2002). A human homolog of Vg, named TONDU, was identified and found to be substitute for Vg in wing formation in *Drosophila* (Vaudin *et al.*, 1999). This was the first discovery of a protein belonging to a family of proteins that is homologous with Vg. Designated as Vestigial-like (or Vgll), this family comprises four members in vertebrates (Vgll1-4).

Since their characterization in *Drosophila*, *Vestigial-like* genes have been described in several vertebrates and some studies have described the functional properties some of them may have. Because of their interaction with TEADs, vestigiallike proteins undoubtedly have a profound effect on numerous functions, with a potential action at nodal points in several cellular processes mediated by TEADs. TEADs are encoded by a gene family comprised of four members in mammals (TEAD1-4). TEAD1 is the founder of this family; initially described as the transcriptional

enhancer (aka TEF-1), it binds to the simian virus 40 (SV40) enhancer (Xiao et al., 1991). Among other transcription factor families, TEADs form a unique family of proteins with pleiotropic function that varies depending on the cell-type, developmental contexts or the interacting partners. They not only regulate important physiological processes such as cell differentiation, cell proliferation and stem cell maintenance but also play a role in human cancers (Pobbati and Hong, 2013). The latter function mainly concerns the Hippo pathway, where TEADs interact with YAP1 (*Drosophila* yorkie homolog), the transcriptional effector that mediates cell-growth and oncogenic transformation in this pathway (Harvey et al., 2013).

While extensive knowledge has been accumulated about the functions of TEADs in vertebrates, little is known about Vestigial-like, with the exception of recent data suggesting their pleiotropic functions in both development and cancer. Indeed, a recent study has identified a corepressor for Sd in *Drosophila*, namely Tgi. Considered as the mammalian ortholog of Vgll4, it can suppress the YAP1-induced overgrowth of tissues in mice (Koontz et al., 2013). Here we focus on our current knowledge of *Vestigial-like* genes. In this study, we present an inventory of all known vertebrate genes and their orthologs in basal animals in order to highlight the early evolution of this gene family. We take a closer look at the structural organization of selected members, and provide an overview of current knowledge about their functions, including the most recent findings on the subject.

Evolution of the *Vestigial-like* gene family

Vestigial (Vg) was originally described in *Drosophila* as a nuclear protein able to control wing and haltere development through its interaction with the TEAD transcription factor family protein Scalloped (Sd) (Halder *et al.*, 1998, Williams *et al.*, 1991). The interaction of Vg with mammalian TEAD1 protein and the fact that TEAD1 could be used as a substitute for Sd during wing development, led authors to postulate that a mammalian ortholog of Vg existed, and subsequently identify it as the protein TONDU (Deshpande *et al.*, 1997, Simmonds *et al.*, 1998, Vaudin *et al.*, 1999). TONDU contains a 24 amino acid domain (Tondu domain or TDU) that is homologous with the Vg domain and necessary for its interaction with Sd (Vaudin *et al.*, 1999). TONDU was the first mammalian homolog to Vg to be described, and has been now renamed “Vestigial-like 1” (VGLL1) to meet the requirements of the HUGO Gene Nomenclature Committee. Since then, several genes encoding proteins with a Tondu domain have been identified in different species, helping to form the *Vestigial-like* genes family comprised of two genes in *Drosophila* and four to five genes in vertebrates, depending on the species (Table 1). Human VGLL2 (or VITO-1) and VGLL3 (or VITO-2) are paralogs of VGLL1 and were characterized independently in several different groups (Maeda *et al.*, 2002, Mielcarek *et al.*, 2002, Mielcarek *et al.*, 2009). Like VGLL1, they encode proteins with a single Tondu domain, constituting a subgroup of the Vestigial-

like gene family. The presence of three paralog genes in vertebrates can be attributed to previous genome duplication events occurring in vertebrate evolution, and are exemplified by several gene families that were found to have expanded from a single member in invertebrates to three to four members in vertebrates (Panopoulou et al., 2003). This is the case for the *Vestigial-like* gene family where there is a single protein in early deuterostomes such like sea urchin or lancelet (see below).

The *Vestigial-like* gene family showed an additional level of complexity following the identification of proteins possessing two Tondu domains. *VGLL4*, initially identified in the human and the mouse through a search for TDU motifs in protein databases, is the archetype of these proteins and constitutes a second subgroup in the gene family (Chen et al., 2004b) (Table 1). *VGLL4* has two TDU motifs that diverge from the consensus sequence, although they still mediate interaction with TEAD1 (Chen et al., 2004b). It is now established that there are four *Vestigial-like* genes in mammals (*Vgll1-4*), but the situation may differ in other vertebrate taxa, depending on their evolutionary history. For instance, two *Vgll2* genes (*Vgll2a* and *Vgll2b*) have been described in zebrafish (Hamade et al., 2013a, Johnson et al., 2011, Mann et al., 2007). They correspond to duplicated genes, as described by current view about the occurrence of whole-genome duplication in the teleost lineage following divergence from the tetrapod lineage (Hoegg et al., 2004, Jaillon et al., 2004). In the amphibian *Xenopus*, four *Vestigial-like* genes have been described that are true orthologs of their mammalian counterparts (Faucheux et al., 2010). However, a fifth gene, *Vestigial-like 4-like* (or *vgll4l*), with two Tondu domains but showing limited identity with the vertebrate *Vgll4*, was identified in this amphibian with no equivalent in birds or mammals (Barrionuevo et al., 2014) (Table 1). *Vgll4l* gene has also been identified in zebrafish, indicating that these homeologs have resulted from a duplication event limited to amphibians and fishes (Melvin et al., 2013).

Until very recently, *Vestigial* was the only *Drosophila* protein known to possess a Tondu domain. However, another protein with a Tondu domain was identified during screens seeking components of the Hippo pathway or partners of Sd. This protein, named Tgi (for Tondu-domain containing Growth inhibitor) or SdBP (for ScallopedBinding-Protein), contains two Tondu domains (TDU1 and TDU2) and can interact with Sd (Guo et al., 2013, Koontz et al., 2013) (Table 1). Tgi was found to be homologous with the mammalian *Vgll4* and was shown to act as a cofactor in the repression of Hippo target genes (Guo et al., 2013, Koontz et al., 2013). A phylogenetic analysis confirmed the clusterings of Tgi with *VGLL4* and *Vg* to *VGLL1*, 2 and 3 (Koontz et al., 2013).

A growing number of genomic sequences are now available, facilitating the study of the evolutionary history of gene families. We have screened databases and identified proteins containing Tondu domain in representative species in order to establish the presence of *Vestigial-like* proteins at different levels of a phylogenetic tree (Fig. 1). We have characterized a total of 15 genomic clones containing Tondu domain from different species. Two subfamilies of *Vgll* genes can be distinguished. One subfamily comprises genes that encode proteins with a single Tondu domain, such as

Vgll1-3 or *Drosophila* Vg. These genes are only found in metazoa and are, moreover, restricted to bilateria. They are not found in sea anemones (cnidaria) or in sponges (porifera). During the diversification of bilateria, the number of genes in this subfamily increases from one member in basal species (Vgll) to three members in mammals (Vgll1-3) (Fig. 1). This increase can be explained by the genome duplication events that occurred in vertebrate evolution, and is further supported by the presence of a single protein in basal bilaterians such as ascidians, lancelets or sea urchins (Dehal and Boore, 2005).

The second subfamily comprises Vestigial-like genes that encode proteins with two Tondu domains (Vgll4/Tgi). These genes have been identified not only in Bilateria but also in Cnidaria, Porifera and in the unicellular filasterean species *Capsaspora owczarzaki*, indicating a premetazoan origin for this gene family (Koontz et al., 2013) (Fig. 1). In contrast to the *Vgll1-3/vg* subfamily, a single member of the *Vgll4/tgi* subfamily has been found in each of the species analyzed. This suggests that *Vgll4* has not been subjected to duplication events, or that any duplicated genes have been lost, although this is unlikely. For comparison, TEAD genes have a longer evolutionary history than *Vestigial-like* genes and are present in the unicellular free-living amoebae *Acanthamoeba castellanii* (Sebe-Pedros et al., 2012) (Fig. 1).

Synteny analysis confirms the relationship between vertebrate *Vestigial-like* genes (Fig. 2). Indeed, there is a remarkable conservation between mammal (mouse and human), avian (chicken), amphibian (*Xenopus*) or fish (zebrafish) genes, confirming phylogenetic analysis. Except for the amphibian *vgll4* gene, which cannot be analysed in detail due to its location on a small genomic scaffold, the order and orientation of genes that flank the different vertebrate *Vgll* are highly conserved. In zebrafish, *vgll1*, *vgll2* and *vgll4* are duplicated and correspond to homeologs (identified as a and b in Fig. 2). This is related to the ancient fish-specific genome duplication that occurred in the teleost lineage after divergence from tetrapods (Taylor et al., 2003). The conserved synteny of zebrafish *vgll1a*, *vgll2a* and *vgll4b* with their vertebrates cognates indicates that they are true orthologs of mammalian genes. *Vgll4l* from amphibian and fishes displayed a conserved synteny (Barrionuevo et al., 2014)

Gene structure and organization of the *Vestigial-like* gene family

In most of the species on the phylogenic tree in Fig.1, we have identified the genomic regions containing sequences related to Tondu domain, then set out the corresponding gene structure and carried out a comparison between species. At the genomic level, *Vestigial-like* genes display some heterogeneity but also show features that have been conserved during evolution (Fig. 3). When considering vertebrate genes that encode a protein with a single Tondu domain, *VGLL1* genes display exon numbers that vary from three in fish to six in mouse, with exon 1 being an exon leader. Surprisingly, mouse *Vgll1* is distinct from its human ortholog, with the presence of an additional intron (Fig. 3). *VGLL2* genes have a more conserved structure comprising

four exons and a conserved splicing pattern with an identical class of intron (not shown). However, mouse *Vgll2* do not share the same characteristics and has lost one intron, comprising three exons instead of four. *VGLL3* genes display the more conserved structural pattern with an identical splicing (not shown), although the size of exons differ slightly between species (Fig. 3). *VGLL2* genes are of a comparable size but are smaller than *VGLL1* or *VGLL3* genes; in the last two cases, the mammalian genes are larger than their orthologs due to longer intronic regions. The location of the Tondu domain in exon 2 is common to all *VGLL1-3* genes.

In invertebrates, the genes encoding proteins with a unique Tondu domain display a greater structural heterogeneity with respect to exon numbers, which range from two in worm to eight in *Drosophila* which is so far the most complex gene in the family. The Tondu domain is found in the second exon of all the species considered, with the exception of *Drosophila* (where it is located in the 4th exon), amphioxus and worm (incomplete sequences). Surprisingly, the genomic sequence encoding Tondu domain in oysters is split between two consecutive exons, with the first 20 amino acids on one exon and the last 4 amino acids located on the following exon (Fig. 3).

When considering the *Vgll4/tgi* subfamily, all vertebrates except zebrafish (excluded due to an incomplete sequence) show a highly conserved structural organization with six exons and two alternative promoters (Fig. 3). Although they differ slightly in respect to exon size, vertebrate *Vgll4* genes display the same splicing pattern and all have the two Tondu domains located in the last exon, strictly spaced by an 18 amino acid linker sequence (Fig. 3). Invertebrates display a greater variation in terms of exon numbers, which range from three in the sea anemone to six in *Drosophila*. Again, the *Drosophila* gene is the most complex of the family and contains two alternative promoters, like its vertebrate orthologs. To date, there is no evidence of two promoters in any other invertebrate genes. Invertebrate *Vgll/Tgi* genes are much more smaller than their vertebrate orthologs, and display a highly variable spacing between the two TDU domains ranging from 20 amino acids in the sea anemone to 219 amino acids in *Drosophila* (Fig. 3). More surprisingly, the two Tondu domains are even split between two successive exons in annelid and oyster genes, suggesting a complex gene structure evolution of the ancestral gene. Given the high conservation of the two Tondu domain sequences, one may hypothesize that they split across two exons during the course of evolution in some lineages.

Although the *vgll4l* genes found in amphibians and fishes encode proteins with two Tondu domains, they have limited similarity with the *vgll4* proteins (less than 40% for amphibian proteins) (Barrionuevo *et al.*, 2014). However, *vgll4l* and *vgll4* can be considered to be homeolog genes resulting from duplication events. They show a remarkable conserved structural organization, with five exons displaying only slight size variations (Fig. 3). In both *vgll4l* and *vgll4*, the two Tondu domains are encoded in the last exon but are separated by a 15 (zebrafish) or 20 (*Xenopus*) amino acid sequence linker in *vgll4l* compared to the 18 amino acids linker region in *Vgll4*.

The Tondu domain as an evolutionary unit

The Tondu domain mediates the interaction with TEAD proteins and is specific to Vestigial-like proteins. Outside it, the proteins show little or no similarity. In the subgroup Vgll1-3/Vg, the Tondu domain (TDU) is 24 amino acids long and is found close to the N-terminal end, while it is located in a more central position in *Drosophila* (Fig. 4A). In terms of sequence conservation, the Tondu domains in vertebrate genes can be classified as VGLL2>VGLL3>VGLL1, ranging from total conservation in VGLL2 genes to more divergent in VGLL1 genes. The Tondu domain is more divergent between invertebrates species but is at least 50% identical to vertebrate domains (Fig. 4B). In the Vgll4/Tgi subfamily, the two domains TDU1 and TDU2 are each 10 amino acids long, and are highly conserved from sponges to mammals and in Vgll4l proteins (Fig. 4C and data not shown). A striking feature is that the sequences of the two domains are very similar to the last 10 amino acids of the Tondu domain found in the Vgll1-3/Vg subfamily. Moreover, the core domain VD/ED/EHF (VxxHF), which has been found crucial for interaction with TEAD proteins, is highly conserved between all Vgll proteins (Fig. 4B, C, grey shading) (Pobbati *et al.*, 2012). Because TDU1 and TDU2 are found early in evolution, before the appearance of TDU in bilaterians, they may be considered as the ancestral Tondu domain and constitute the basic evolutionary unit of Vgll proteins. This unit is present in two copies in the ancestral Vgll protein, and was submitted to selection pressure in order to acquire the functional ability to interact with TEAD. One may speculate that the 24 amino acid TDU domain present in the Vgll13/Vg subfamily appeared during the transition that gave rise to bilaterians. The total conservation of the VxxHF motif between TDU2 and TDU (Fig. 4B, C) leads us to the hypothesis that after duplication, one duplicated TDU2 gave rise to TDU by recruiting an extra 14 amino acid contiguous region, and this novel TDU domain was then subjected on evolutionary constraint in bilaterians to maintain interaction with TEAD.

The contribution of the Tondu domains in mediating interaction with TEAD has been demonstrated for both *Drosophila* Vg and human VGLL1, and mutational analysis showed that both N-terminal and C-terminal portions of TDU are involved in the binding of Vestigial to TEAD (Simmonds *et al.*, 1998, Vaudin *et al.*, 1999). Human TEAD1 is a 426 amino acid protein whose region 205-329 has been shown to be required for interaction with Vgll1 and is well conserved with the *Drosophila* Sd protein (Vaudin *et al.*, 1999). The structure of the complex between the transcription cofactor Vgll1 and the transcription factor TEAD4 was recently determined, and the interaction between proteins has been found to be mediated by an interface region of Vgll1 where the motif ⁴¹VxxHF⁴⁵ is crucial (Pobbati *et al.*, 2012) (Fig. 4D). The mutation of both VxxHF motifs present in TDU1 and TDU2 of Tgi and Human VGLL4 is necessary to abolish the interaction with TEAD, highlighting its functional importance (Guo *et al.*, 2013, Koontz *et al.*, 2013). Surprisingly, a similar interface mediates protein interaction between TEAD (or Sd in *Drosophila*) and YAP1 (or Yorkie, Yki in *Drosophila*),

suggesting competition between proteins for the formation of a complex with TEAD (Cagliero *et al.*, 2013, Pobbati *et al.*, 2012).

Expression and function of Vestigial-like family members

Although a wealth of data has been generated about the function of Vestigial in *Drosophila* since its description and identification, the roles played by vertebrate orthologs have been little explored to date. The gene expression of *Vgll* members in vertebrates has been achieved, but their function still remains to be described, and knockout mouse models or data from knockdown strategies are pending. Clinical studies have highlighted possible roles played by human *Vgll* in gene expression and diseases, namely cancer.

Drosophila melanogaster Vg

The mutant *vestigial* (*vg*), in which part of the wing is present, is one of the most familiar and studied mutants in *Drosophila melanogaster* in which a considerable number of alleles have been isolated and described. In the absence of a functional wild-type gene, extensive cell death occurs in the wing imaginal disc, resulting in a complete loss of wing margin structures (Fristrom, 1969). Furthermore, the mutant homozygous fly with a null *vg* allele has reduced viability, female sterility and shows a degeneration of indirect flight muscles, a specific subset of thoracic muscles (Bernard *et al.*, 2009). The molecular cloning of the gene was first carried out via P-element tagging, defining a 19kb region required for *vg* function followed by the identification of a 3.8kb transcript that mapped this region (Williams *et al.*, 1990, Williams and Bell, 1988). *Vg* is composed of 8 exons and is first expressed during embryogenesis in a small group of cells that will define the wing primordium. Its expression is then spatially restricted to the presumptive wing and haltere imaginal discs during larval stages and in the central nervous system (Williams *et al.*, 1991, Zider *et al.*, 1996). *Vg* expression has been shown to be regulated by an intronic regulatory element that is evolutionarily conserved between *Drosophila melanogaster* and *Drosophila virilis* (Williams *et al.*, 1991). The wing-specific expression of *Vg* is mediated through two enhancers (*vg*^{BE} and *vg*^{QE}) that are sequentially activated during development and occur under the control of both dorsoventral and anteroposterior signaling systems that pattern the wing (Kim *et al.*, 1996, Klein and Martinez Arias, 1999, Williams *et al.*, 1994). The overall expression of *vg* is the sum of inputs from Notch, wingless and dpp signals that are integrated in distinct cis-regulatory modules (Carroll *et al.*, 2001).

Vg has been categorized as a selector protein owing to its necessary role in wing formation and its ability to reprogram cells in the leg and other imaginal discs to adopt a wing fate (Kim *et al.*, 1996, Mann and Carroll, 2002, Williams *et al.*, 1991). This protein has 453 amino acids and does not display any known nucleic acid-binding

motif, but is located within the nuclei of cells that are destined to form wing structures (Williams and Bell, 1988, Williams *et al.*, 1991). Several lines of evidence have suggested that Vg could act with a partner to perform its function, and this led to the assumption that Scalloped (Sd) was this partner. Indeed, *vg* and *sd* are both required for wing development, and they present similar patterns of expression in wing discs and mutant phenotypes (Campbell *et al.*, 1992, Campbell *et al.*, 1991, Williams *et al.*, 1993). The necessity of interaction between Vg and Sd to promote wing development and the regulation of wing-specific gene expression has already been established in independent studies (Halder *et al.*, 1998, Paumard-Rigal *et al.*, 1998, Simmonds *et al.*, 1998). The Vg-Sd interaction domain has been mapped to a 56 amino-acid domain of Vg, while the Vg-binding region of Sd maps to the carboxy-terminal half of the protein (Simmonds *et al.*, 1998). Sd is part of a highly conserved family of transcription factors containing a TEA domain, and the human ortholog TEAD1 can bind to Vg with a similar affinity (Campbell *et al.*, 1992, Jacquemin and Davidson, 1997, Simmonds *et al.*, 1998). Genetic and biochemical studies support a model in which Vg and Sd form a heterodimer or a heterotetramer that bind DNA through the TEA domain of Sd (Halder and Carroll, 2001, Halder *et al.*, 1998). The complex is required for cell proliferation and cell survival in the wing imaginal disc (Delanoue *et al.*, 2004). Vg expression is not restricted to presumptive regions of wing and halter imaginal disc, and is also found in specific subgroups of myoblasts (adepithelial cells) in the developing wing disc epithelium that will subsequently form a subset of thoracic muscles (Sudarsan *et al.*, 2001). Vg has been shown to regulate muscle development and differentiation in *Drosophila*, and this property might necessitate its interaction with the key myogenic factor Dmef2 (Bernard *et al.*, 2003, Deng *et al.*, 2009, Sudarsan *et al.*, 2001). This property seems to be an evolutionarily conserved trait, as mammalian Vgll2 has been found interacting with MEF2 to activate MEF2-dependent promoters and stimulate muscle differentiation induced by MyoD (Maeda *et al.*, 2002).

The activities of Sd/Vg complexes depend on their subcellular localization. Indeed, Vg is mainly cytoplasmic but becomes nuclear in the presence of Sd (Halder *et al.*, 1998, Simmonds *et al.*, 1998); (Wu *et al.*, 2008, Zhang *et al.*, 2008); Goulev *et al.* 2011). This effect depends on a nuclear localization signal present in Sd (Magico and Bell, 2011; Srivasta *et al.* 2002). Interestingly, it has been shown that the Hippo signaling pathway can promote Sd and Sd/Vg cytoplasmic localization, thus affecting its transcriptional activity regardless of Yki (Cagliero *et al.*, 2013).

There is *in vitro* evidence that *Drosophila* Vg can change the DNA target selectivity of Sd (Halder and Carroll, 2001). Several observations corroborate these conclusions *in vivo*. Indeed, *vg* expression in the wing imaginal disc is under the control of the Notch pathway. It has been shown that in the central region of the wing pouch where Notch is active, Notch prevents Sd/Yki target gene expression (expanded, *Diap1,dmyc*) by inducing high levels of *vg* expression, promoting Sd/Vg complexes (Djiane *et al.*, 2014). This indicates that the ratio between Sd, Yki and Vg is important

to determine whether Sd forms a complex with Yki or with Vg, allowing the induction of different set of target genes. The same situation probably exists in mammals, where TEAD4/VGLL1 activates target genes unactivated by TEAD4/YAP1, and *vice versa* (Pobbati *et al.*, 2012). For example, Insulin-like-Growth Factor Binding-Protein-5 (IGFBP-5) is induced by TEAD/VGLL1 and not by TEAD/YAP1. This conclusion is supported by the observation of competition between VGLL1 and YAP1 or Vg and Yki for Sd binding, in which VGLL1 and Vg successfully bind with Sd. This suggests that Sd binds to Vg or Yki in a mutually exclusive manner excluding the formation of a trimeric complex between Sd, Vg and Yki (Cagliero *et al.*, 2013, Pobbati *et al.*, 2012).

***Drosophila melanogaster* Tgi**

Tgi was first identified in a screen seeking genes that regulate the Hippo pathway in *Drosophila melanogaster*. Overexpression of *Tgi* was found to decrease eye and wing size (Koontz *et al.*, 2013). *Tgi* was also identified (under the name SdBp for SdBinding-Protein) in a yeast two-hybrid screen aiming to identify new Sd partners (Guo *et al.*, 2013). *Tgi* is ubiquitously expressed in wing and eye discs and in adult fly and can produce two transcripts (RA and RB in Fig.4) through alternative promoters that only differ in the first coding exon. The two proteins produced by *tgi* (RA and RB) are 536 and 383 amino acids long respectively, but have no distinguishable difference in function and subcellular localization (Guo *et al.*, 2013). In contrast to Vg, *Tgi* contains two Tondu domains (TDU1 and TDU2) that are 10 amino acids long and are highly conserved with the two domains found in vertebrate VGLL4. In addition to the Tondu domains that mediate interaction with Sd, *Tgi* has three PPxY motifs enabling it to interact with WWdomain-containing proteins such as Yorkie (Yki) and members of the Hippo pathway (Fig. 4A). *Tgi* stands for **T**ondu-domain-containing **g**rowth **i**nhibitor and accordingly, it was demonstrated to act as a repressor of the Hippo pathway by direct binding to Sd, thus inhibiting the transcriptional activation of the Sd-Yki complex (Guo *et al.*, 2013, Koontz *et al.*, 2013). Although *Tgi* can interact with both Sd and Yki, one report suggested that the *Tgi*-Sd interaction played a more critical role than *Tgi*-Yki and proposed a model in which *Tgi* is a cofactor involved in Sd's default repressor function (Koontz *et al.*, 2013) (Fig.5A, model 1). The link between this Sd default repressor function and *Tgi* illustrates that while Yki needs to interact with Sd to regulate tissue growth, Sd is not essential for tissue growth and cell survival. Indeed, in the absence of Yki, Sd/*Tgi* complexes repress target genes involved in tissue growth and cell survival, while in the absence of Sd, these genes remain expressed at basal levels. In this model, physiological levels of Yki do not promote normal tissue growth by "activating" transcription, but rather by relieving the repressor activity of Sd. The possible presence of additional Sd corepressors (protein X in Fig. 5A) has been suggested, since *Tgi* plays a partial role in Sd-mediated default repression (Koontz *et al.*, 2013). Another model has been proposed in which Sd, Yki and *Tgi* form a trimer

and where the Tgi-Yki interaction is as important as Tgi-Sd interaction (Guo *et al.*, 2013) (Fig. 5B, model 2). In this model, Tgi and Yki compete with each other for Sd binding in a concentration-dependent manner. When Tgi is overexpressed, it forms a repressive complex with Sd-Yki in the nucleus and inhibits their activity. In the absence of Hpo signaling or in the case of Yki overexpression, abundant Yki proteins translocate into the nucleus and bind with Sd, whether or not Tgi is present (Fig. 5B, model 2).

Phylogenetic analysis confirmed that VGLL4 is the mammalian ortholog of Tgi, and that human VGLL4 can phenocopy Tgi-dependent suppression of tissue overgrowth when overexpressed in *Drosophila* (Koontz *et al.*, 2013). Moreover, a recent study demonstrated a potential conserved role played by VGLL4 in growth control through antagonizing the Hippo pathway in a transgenic mouse model of hepatocellular carcinoma induced by YAP1 (mammalian Yorkie ortholog) overexpression. In this model, VGLL4 can block YAP1-induced overgrowth and tumorigenesis (Koontz *et al.*, 2013). Since these findings, several reports have confirmed the anti-oncogenic functions of VGLL4 in various models (Jiao *et al.*, 2014, Li *et al.*, 2015a, Zhang *et al.*, 2014). Tgi and Vg, the two Tondudomain-containing proteins in *Drosophila*, differ not only in their structure (one versus two Tondu domains) but also in their function as either an activator (Vg) or repressor (Tgi) through Sd binding. One other remarkable feature common to both proteins is the presence of three PPxY sites in Tgi. The presence of these motifs very early in the evolution of the Vgll family suggests that the function conferred by the TDU ancestral unit is related to the interaction with YAP1 family members and, like Hippo signaling, most probably predates metazoan origins (Sebe-Pedros *et al.*, 2012)

Vgll1 (TONDU)

Human VGLL1 was first described during a search for a human protein homolog of the *Drosophila* Vestigial (Vaudin *et al.*, 1999). The human cDNA identified was named TONDU (or TDU) and encodes a 258 amino acid protein whose homology with *Drosophila* Vg is limited to a 24 amino acid domain that is essential for its interaction with Sd. Among the four vertebrate VGLL proteins, VGLL1 is the least well conserved between species, showing less than 30% of sequence identity outside the Tondu domain. TONDU was shown to be a transcriptional activator through its interaction with TEAD and was able to rescue the loss of Vg function in *Drosophila* (Vaudin *et al.*, 1999).

The expression of VGLL1 in human fetal tissues was found to be expressed in the lung and kidney but not in the brain or liver, while its expression in adult tissue is enriched in the placenta (Table 2) (Maeda *et al.*, 2002, Vaudin *et al.*, 1999). In *Xenopus*, *vgll1* is expressed in the prospective epidermis of the embryo and solely in the skin of adults (Faucheux *et al.*, 2010). Although the role played by Vgll1 in development and disease in mammals is not known, a recent report identified miR934, which presents a marked overexpression in breast cancer, in intron 4 of the human VGLL1 gene (Castilla *et al.*, 2014). A correlation was found between VGLL1 and miR-

934 expression, suggesting a potential oncogenic role in breast cancer (Castilla et al., 2014). These observations may be linked to studies showing that Vgll1 can form a complex with TEAD4, activating several proliferating promoting genes and thus facilitating anchorage-independent cell proliferation (Pobbati et al., 2012). However, a specific function of VGLL1 in human cancer inferred from *in vivo* studies remains to be established.

Vgll2 (VITO-1)

The human *VGLL2* gene was identified in a BLAST search for genes containing homolog sequences of *Drosophila melanogaster* vg, and a cDNA was then amplified from human skeletal muscle (Maeda et al., 2002). Concomitantly, a cDNA encoding VGLL2 (or VITO-1) was isolated using a subtractive hybridization approach to identify genes expressed in human skeletal muscle (Mielcarek et al., 2002). The human VGLL2 is 317 amino acids long, with a Tondu domain that is identical in all vertebrate proteins displaying 60% identity in the overall protein. *Vgll2* has also been characterized in zebrafish, chicken and *Xenopus* (Bonnet et al., 2010, Faucheux et al., 2010, Hamade et al., 2013b, Mann et al., 2007).

In all the vertebrate species analysed, *Vgll2* expression was mainly localized on sites in the somitic myotomes of the early embryo and later, in the skeletal muscle (Table 2). This is in agreement with the upregulation of *Vgll2* expression observed during muscle differentiation of C2C12 myoblasts (Maeda et al., 2002, Mielcarek et al., 2002). In chicken and *Xenopus* embryos, *Vgll2* is expressed downstream of myogenic factors (Bonnet et al., 2010, Faucheux et al., 2010). *Vgll2* has no myogenic activity *per se*, but it can enhance the MyoD-mediated myogenic conversion of fibroblast cells through its binding to TEAD and is a prerequisite for skeletal muscle differentiation, indicating a crucial role as a cofactor in the muscular regulatory program (Chen et al., 2004a, Fristrom, 1969, Gunther et al., 2004, Maeda et al., 2002). *Vgll2* not only interacts with TEAD but is also able to interact with the muscle regulatory factor MEF2 to activate MEF2-dependent promoter genes in cell culture (Maeda et al., 2002). The analysis of six1/six4 mutant mice suggests that *Vgll2* function could be related to the activation of slow-type muscle genes during muscle development. Indeed, *Vgll2* expression is higher in slow-type myofibers than in fast-type myofibers and is not affected in six1/six4 mouse mutants where the fast-type muscle program has been disrupted (Niro et al., 2010). Remarkably, the function of *Vgll2* in the muscle differentiation program seems to be a conserved feature in evolution. *Drosophila* Vg has been shown to be a muscle-specific identity gene for flight muscle, able to form a tripartite complex with Sd and Dmef2 in order to achieve a full differentiation program of indirect flight muscles (Caine et al., 2014, Deng et al., 2010). In this case, Vg has been shown to be able to interact with Dmef2 at a different site than where it interacts with Sd (Deng et al., 2009). Besides its major expression pattern in muscle, the expression of *Vgll2* has also been shown in the vertebrate embryo, occurring in

pharyngeal arches and in a discrete region of the ventral forebrain that correspond to the future ventromedial hypothalamus (Bonnet *et al.*, 2010, Faucheux *et al.*, 2010, Johnson *et al.*, 2011, Kurrasch *et al.*, 2007). A morpholino-based knock-down analysis in zebrafish embryo pharyngeal arches showed that *vgll2a* is required for the survival of the pharyngeal endoderm, and play a role in the development of the neural crest cell-derived craniofacial skeleton (Johnson *et al.*, 2011). Surprisingly, a genotype-phenotype correlation has been made in the human, with an emphasis on *VGLL2* as part of a chromosome 6 deletion where individuals display, amongst other phenotypic traits, dysmorphic features of the face, obesity and hyperphagia (Rosenfeld *et al.*, 2012).

Vgll3 (VITO-2)

Human *VGLL3* was first identified on chromosome 3 as a partial sequence corresponding to the TEAD interaction domain (Maeda *et al.*, 2002). Mouse *Vgll3* cDNA was characterized using *in silico* screening of EST databases with the Tondu domain, and named VITO-2 owing to 96% similarity with VITO-1 (*Vgll2*) over the TEAD interaction domain (Mielcarek *et al.*, 2009). *Vgll3* has also been cloned and characterized in the amphibian *Xenopus* (Faucheux *et al.*, 2010). The vertebrate gene is the best conserved of the gene family in terms of structure, displaying four exons and a conserved splicing pattern (see Fig. 3). Only slight differences can be observed between the different *Vgll3* ortholog genes in terms of exon size, giving rise to proteins that range from 310 amino acids in the frog to 330 in zebrafish. One peculiarity of vertebrate proteins is the presence of an histidine repeat of 6 or more residues, a relatively uncommon feature found in only 86 human proteins (Salichs *et al.*, 2009). While human *VGLL3* contains a single seven histidine repeat, the mouse protein contains a six histidine repeat and the amphibian protein contains two histidine repeats (of 7 and 8 amino acids). Proteins containing histidine repeats are mostly involved in DNA- and RNA-related functions and these repeats cause them to accumulate in nuclear speckles (Salichs *et al.*, 2009). Surprisingly, most of these proteins are expressed in the brain and/or nervous system development, as observed in *Vgll3* (Table 2).

In the *Xenopus* embryo, *vgll3* has a unique expression pattern and is a specific marker of hindbrain rhombomere 2 (Table 2) (Faucheux *et al.*, 2010). In E10.5 mouse embryo, *vgll3* is transiently expressed in the neuroepithelium at the location of the future midbrain before its expression becomes apparent in somites at E9.5, followed by expression in dorsal root ganglia at E13.5 (Mielcarek *et al.*, 2009). Expression of *Vgll3* has also been found in chicken embryo hindbrain (Duprez S, personal communication). Due to its restricted expression to rhombomere 2, *Vgll3* constitutes a good marker for the analysis of the regulatory network that regulates the development of this hindbrain domain. During mouse development, *Vgll3* also marks the myogenic lineage (Mielcarek 2009). Surprisingly, *Vgll3* was the most strongly upregulated genes observed in a screen designed to identify targets of the myogenic regulator Pax3,

suggesting that it could be involved downstream of Pax3 in the regulatory muscle program (Lagha et al., 2010). In adult human tissues, VGLL3 is mainly expressed in the placenta, while, it is more widely expressed in the adult mouse and amphibian, where it is found in the brain, kidney, liver, stomach or heart (Table 2) (Faucheux et al., 2010, Mielcarek et al., 2009).

A recent report using an *in vitro* cell differentiation system has highlighted a role for Vgll3 as a negative regulator of the adipocyte differentiation program (Halperin et al., 2013). Indeed, *Vgll3* expression is down regulated during adipogenesis, whose differentiation can either be inhibited by overexpression of Vgll3, or promoted by its knockdown. Several studies have pointed out a potential role of Vgll3 in regulation of tumorigenesis. This stems from a study revealing that the transfer of a fragment of human chromosome 3 could suppress tumorigenicity of an ovarian cancer cell line (Cody et al., 2007). Among the genes present on the transferred chromosome is *VGLL3*, whose expression was upregulated in transformed cell and underexpressed in malignant ovarian tumor samples. This suggests that *VGLL3* plays a role in the tumor suppression pathway (Cody et al., 2009, Gambaro et al., 2013). More recently, studies seeking to characterize biomarkers for the estimation of prostate cancer survival identified *VGLL3* as a signature to categorize patient survival (Peng et al., 2014). However, opposite conclusions were reached regarding soft tissue sarcomas, where *VGLL3* overexpression was found to be correlated to gene amplification (Antonescu et al., 2011, Hallor et al., 2009, Helias-Rodzewicz et al., 2010). In such sarcomas, the *TEAD* cofactor *YAP11* was also found to be amplified with *VGLL3*, and the inhibited expression of both genes in derived cell lines lead to anti-oncogenic features (Helias-Rodzewicz et al., 2010). *VGLL3* has been found to be overexpressed in the cartilage of adult patients with endemic osteoarthritis, compared to normal joint cartilage (Wang et al., 2009). A recent case report describes a patient showing growth pattern problem and displaying a microdeletion of the chromosome 3 region that contains *VGLL3* (Gat-Yablonski et al., 2011).

Vgll4

Human *VGLL4* was identified in database as a human protein containing two TDU domains (Chen et al., 2004b). The two domains are 10 amino acids long, spaced by an 18 amino acid linker region, and totally conserved amongst vertebrate proteins. Initially, a single type of Vgll4 protein was found in databases, but other proteins with distinct N-terminal sequence were subsequently identified. A comparison between mRNA and genomic sequences reveals that the different Vgll4 proteins are produced by two alternative promoters (Fig. 3). A close inspection of Vgll4 vertebrate genes indicates that mammalian, avian and amphibian genes have a totally conserved structure comprising two promoters and six exons, and can encode proteins of 282 to 296 amino acids. Surprisingly, the *Vgll4 Drosophila* ortholog *Tgi* also has two promoters, but the two TDU domains are separated by a 219 amino acid linker region instead of the 18 amino acid linker found in vertebrates genes. Another difference

between Tgi and Vgll4 proteins is the presence of three PPxY motifs in the *Drosophila* protein allowing the interaction with WW domain-containing proteins such YAP1, while such motifs are absent in the vertebrate protein (Koonen et al. 2013). Oyster and sponge Tgi proteins also contain a PPxY motif (Fig. 3), suggesting that Vgll4/Tgi was already able to interact with YAP1/Yorkie in early evolution, but lost this ability following the separation of protostome and deuterostome.

The two TDU domains of Vgll4 have been shown, to be involved in the interaction with TEAD proteins in both *Drosophila* and mammalian cells (Chen et al., 2004b, Guo et al., 2013, Koontz et al., 2013). Similarly to VGLL2, VGLL4 has also been shown capable of interacting with MEF2 (Chen et al., 2004b). In contrast to other *Vgll* genes, *Vgll4* expression is not tissue restricted and its expression is found in the heart, brain and kidney and also in other tissues, albeit at lower levels (Table 2) (Chen et al., 2004b, Faucheux et al., 2010).

The function of VGLL4 was first characterized in cardiac myocytes, where it regulates α -1 adrenergic dependent gene expression (Chen et al., 2004b). In these experiments, VGLL4 was found to be a negative regulator of both α -1 adrenergic and skeletal actin promoter transcription mediated by TEAD1 (Chen et al., 2010). More recently, findings from several studies shed new light on the function of VGLL4. Initially, *Vgll4* was identified as a candidate tumor suppressor gene in pancreatic cancer (Mann et al., 2012). Studies carried out in *Drosophila* and mammalian cells extend this data, independently demonstrating that VGLL4 regulates the hippo pathway by directly competing for the binding of the oncoprotein YAP1 to TEADs, thus blocking the function of the core component of the pathway (Guo et al., 2013, Koontz et al., 2013) (see before and Fig. 5). VGLL4 has since been shown to act as a tumor suppressor in lung and liver cancer (Koontz et al., 2013, Zhang et al., 2014). Interestingly, the two TDU domains of VGLL4 are sufficient to inhibit YAP1 activity, leading a peptide-based YAP1 inhibitor to exhibit potent antitumor in mice gastric cancer tissue (Jiao et al., 2014). The downregulation of VGLL4 in gastric cancer cells is correlated to the expression of miR222, whose level can be enhanced by TEAD1 (Li et al., 2015b). This suggests a positive regulatory loop that maintains low-level VGLL4 tumor suppressor activity. A recent report made in an esophageal carcinoma model further reinforces the argument that VGLL4 plays a role as a tumor suppressor in a variety of human cancers (Jiang et al., 2014). These observations suggest that the tumor suppressor property of VGLL4 could be the direct consequence of its action in the hippo pathway at the level of the core complex TEAD/YAP1 (or Scalloped/Yorkie). VGLL4 was also shown to be a positive regulator of survival in human embryonic stem cells (hESCs), where it can decrease cell death induced by stress (Tajonar et al., 2013). This is in contrast with the finding that VGLL4 is able to relocalize IAP proteins (inhibitor of apoptosis) to the nucleus, thus counteracting their anti-apoptotic activity (Jin et al., 2011).

Vgll4l (Vgll4-like)

In addition to *Vgll4*, a second gene named *vgll4l* has been identified in zebrafish and *Xenopus* (Barrionuevo *et al.*, 2014, Melvin *et al.*, 2013). The amphibian and fishes *vgll4l* encode proteins of 252 and 266 amino acids that have only 30 to 40% identity with *vgll4*, except over the TDU domains. The absence of these genes in the chicken, mouse or human suggests that they are homeologs that have evolved from a duplication event in the shared lineage to fishes and amphibians (Barrionuevo *et al.*, 2014). In *Xenopus*, *vgll4* and *vgll4l* show some differences in their embryonic expression but are both expressed in migrating neural crest cells, which could explain why *vgll4l* knockdown affects cranio-facial development in zebrafish (Melvin *et al.*, 2013).

Conclusions and future directions

Vestigial-like proteins constitute a family of cofactors which share a highly conserved domain (Tondu domain) that is crucial to the formation of a complex with members of the TEAD family of transcription factors. Although the Tondu domain was first described in *Drosophila* (Vestigial), it has a more ancient evolutionary history and was already present in a single premetazoan gene which then has evolved to give four genes in mammals (*Vgll1-4*). Two subfamilies of proteins have appeared over the course of evolution. A first family, corresponding to Vgll4/Tgi, encompasses proteins with two tondu domains encoded by a single gene present from premetazoans to mammals. Vgll1-3/Vg forms a second subfamily comprising proteins with a single tondu domain, found only in bilaterians. The exact functions of those different proteins are still largely unknown, and until now, the wealth of data on *Drosophila* Vg cannot shed any light on this matter, as the formation of wing appendage cannot be readily extrapolated to vertebrates. However, the recent discovery of Tgi has opened new avenues to our understanding and indicates that the two *Drosophila* tondu-domain-containing proteins fulfill distinct functions. Vestigial has a restricted expression and is instrumental in wing formation as a transcriptional coactivator of *scalloped*, while Tgi is widely expressed and functions as a transcriptional corepressor of *scalloped* at the end of the Hippo pathway. Vgll1 and Vgll4 can replace *Drosophila* Vg and Tgi respectively, suggesting a functional conservation that is mainly mediated by the Tondu domain. However, several questions remain to be answered before a comprehensive picture can emerge. What determines the target selectivity of Tgi/Vgll4 versus Vgll1-3/Vg, and what are their target genes? What makes Tgi/Vgll4 a repressor, and Vgll1-3/Vg an activator? Vgll4/Tgi and YAP1/Yki can compete for TEAD/Sd binding, but is there any competition between Vgll1-3/Vg and Vgll4/Tgi for TEAD/Sd binding, and if so, what are the consequences? Until now, TEAD has been found to be the major transcription factor bound by Vgll. However, we cannot exclude other proteins that could form a multiprotein complex with Vestigial-like, either in combination

with TEAD or not, and this complicates the issue further. Such a situation has been described in *Drosophila* where Vg is able to interact with Sd and dMEF2 through different domain to form a multiprotein complex (Deng *et al.*, 2009). Since Vgll1 and Vgll4 have been shown to be able to compete with YAP1 for binding to TEAD, a functional distinction between the two subfamilies is now less obvious. A potential implication of Vgll1-3 in cancer progression in a similar way to Vgll4 should be considered. This is particularly relevant in the case of human VGLL3, whose expression has been found to be either anti-oncogenic or pro-oncogenic, depending on the type of cancer. How can these opposite functions be integrated? Are they connected to Hippo pathway, and if so how? We clearly need to know more about structure/function relationships for both Vgll4/Tgi and Vgll1-3/Vg.

Very few functional knockdown studies have been performed to date, and loss of functions in mouse could provide useful information about not only the effect of Vestigial-like proteins on growth and differentiation, but also their potential redundancy. Vgll2 knockdown in zebrafish has revealed its implication in craniofacial formation and neural crest survival. However, because the major site of *Vgll2* expression in vertebrates is the skeletal muscle lineage, we may expect dramatic effects as a result of its knock down in this lineage. In this respect, it would be interesting to know how Vgll2 can be integrated in the regulatory gene network that governs muscle differentiation. The use of vertebrate models such as *Xenopus* or zebrafish in conjunction with the morpholinos antisense knockdown strategy will also provide relevant information about the functions of the different *Vgll* genes. Studies in basal bilaterian models such as sea urchin, ascidian or amphioxus might shed new light on the early functions of the Vestigial-like subfamilies.

One striking observation is the strong evolutionary conservation of the Tondu domain. This suggests that this unusually short domain performs unique functions that have been placed under selective forces, to be maintained for over 500 million years. Indeed, one can hypothesize that this domain constitutes an evolutionary unit that has been selected to maintain the formation of the Vgll/TEAD complex. As there are no other obvious domains in Vestigial-like proteins, one may wonder what roles, if any, could be played by other regions of the proteins and how these regions impact global function of the complex. Because TEAD proteins are widely expressed and involved in many cellular processes, Vestigial-like proteins can be considered to act at the core of multiple signaling pathways, ensuring fine tuning by either activating or repressing transcription of targets genes. We are only at the beginning of the story, and Vestigiallike proteins have many more functions to reveal in the future. And thanks to the vestigial wings of *Drosophila*, the story has already taken off.

Acknowledgments

This work was supported by the University of Bordeaux and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). We thank Joanna Munro for careful reading of the manuscript and helpful suggestions.

References

- ADOUTTE, A., BALAVOINE, G., LARTILLOT, N., LESPINET, O., PRUD'HOMME, B. and DE ROSA, R. (2000). The new animal phylogeny: reliability and implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4453-6.
- ANDRIANOPOULOS, A. and TIMBERLAKE, W.E. (1991). ATTS, a new and conserved DNA binding domain. *Plant Cell* 3: 747-8.
- ANTONESCU, C.R., ZHANG, L., NIELSEN, G.P., ROSENBERG, A.E., DAL CIN, P. and FLETCHER, C.D. (2011). Consistent t(1;10) with rearrangements of TGFB3 and MGEA5 in both myxoinflammatory fibroblastic sarcoma and hemosiderotic fibrolipomatous tumor. *Genes Chromosomes Cancer* 50: 757-64.
- BARRIONUEVO, M.G., AYBAR, M.J. and TRIBULO, C. (2014). Two different vestigial like 4 genes are differentially expressed during *Xenopus laevis* development. *Int J Dev Biol* 58: 36977.
- BERNARD, F., KASHEROV, P., GRENETIER, S., DUTRIAUX, A., ZIDER, A., SILBER, J. and LALOUETTE, A. (2009). Integration of differentiation signals during indirect flight muscle formation by a novel enhancer of *Drosophila* vestigial gene. *Dev Biol* 332: 258-72.
- BERNARD, F., LALOUETTE, A., GULLAUD, M., JEANTET, A.Y., COSSARD, R., ZIDER, A., FERVEUR, J.F. and SILBER, J. (2003). Control of apterous by vestigial drives indirect flight muscle development in *Drosophila*. *Dev Biol* 260: 391-403.
- BONNET, A., DAI, F., BRAND-SABERI, B. and DUPREZ, D. (2010). Vestigial-like 2 acts downstream of MyoD activation and is associated with skeletal muscle differentiation in chick myogenesis. *Mech Dev* 127: 120-36.
- BRIDGES, C.B. and MORGAN, T.H. (1919). Contributions to the genetics of *Drosophila melanogaster*. *Carnegie Institute of Washington Publication* 278: 123-304.
- BURGLIN, T.R. (1991). The TEA domain: a novel, highly conserved DNA-binding motif. *Cell* 66: 11-2.
- CAGLIERO, J., FORGET, A., DALDELLO, E., SILBER, J. and ZIDER, A. (2013). The Hippo kinase promotes Scalloped cytoplasmic localization independently of Warts in a CRM1/Exportin1-dependent manner in *Drosophila*. *FASEB J* 27: 1330-41.
- CAINE, C., KASHEROV, P., SILBER, J. and LALOUETTE, A. (2014). Mef2 interacts with the Notch pathway during adult muscle development in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* 9: e108149.
- CAMPBELL, S., INAMDAR, M., RODRIGUES, V., RAGHAVAN, V., PALAZZOLO, M. and CHOVNICK, A. (1992). The scalloped gene encodes a novel, evolutionarily conserved transcription factor required for sensory organ differentiation in *Drosophila*. *Genes Dev* 6: 36779.
- CAMPBELL, S.D., DUTTARROY, A., KATZEN, A.L. and CHOVNICK, A. (1991). Cloning and characterization of the scalloped region of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 127: 367-80.
- CARROLL, S., GRENIER, J. and WEATHERBE, S. (2001). *From DNA to diversity*. Blackwell Science.

- CASTILLA, M.A., LOPEZ-GARCIA, M.A., ATIENZA, M.R., ROSA-ROSA, J.M., DIAZMARTIN, J., PECERO, M.L., VIEITES, B., ROMERO-PEREZ, L., BENITEZ, J., CALCABRINI, A. *et al.* (2014). VGLL1 expression is associated with a triple-negative basallike phenotype in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 21: 587-99.
- CHEN, H.H., MAEDA, T., MULLETT, S.J. and STEWART, A.F. (2004a). Transcription cofactor Vgl-2 is required for skeletal muscle differentiation. *Genesis* 39: 273-9.
- CHEN, H.H., MULLETT, S.J. and STEWART, A.F. (2004b). Vgl-4, a novel member of the vestigial-like family of transcription cofactors, regulates alpha1-adrenergic activation of gene expression in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 279: 30800-6.
- CHEN, L., LOH, P.G. and SONG, H. (2010). Structural and functional insights into the TEADYAP1 complex in the Hippo signaling pathway. *Protein Cell* 1: 1073-83.
- CODY, N.A., OUELLET, V., MANDERSON, E.N., QUINN, M.C., FILALI-MOUHIM, A., TELLIS, P., ZIETARSKA, M., PROVENCHER, D.M., MES-MASSON, A.M., CHEVRETTE, M. *et al.* (2007). Transfer of chromosome 3 fragments suppresses tumorigenicity of an ovarian cancer cell line monoallelic for chromosome 3p. *Oncogene* 26: 618-32.
- CODY, N.A., SHEN, Z., RIPEAU, J.S., PROVENCHER, D.M., MES-MASSON, A.M., CHEVRETTE, M. and TONIN, P.N. (2009). Characterization of the 3p12.3-pcen region associated with tumor suppression in a novel ovarian cancer cell line model genetically modified by chromosome 3 fragment transfer. *Mol Carcinog* 48: 1077-92.
- DEHAL, P. and BOORE, J.L. (2005). Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. *PLoS Biol* 3: e314.
- DELANOUE, R., LEGENT, K., GODEFROY, N., FLAGIELLO, D., DUTRIAUX, A., VAUDIN, P., BECKER, J.L. and SILBER, J. (2004). The Drosophila wing differentiation factor vestigial-scalloped is required for cell proliferation and cell survival at the dorso-ventral boundary of the wing imaginal disc. *Cell Death Differ* 11: 110-22.
- DELSUC, F., BRINKMANN, H., CHOURROUT, D. and PHILIPPE, H. (2006). Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature* 439: 965-8.
- DENG, H., BELL, J.B. and SIMMONDS, A.J. (2010). Vestigial is required during late-stage muscle differentiation in Drosophila melanogaster embryos. *Mol Biol Cell* 21: 3304-16.
- DENG, H., HUGHES, S.C., BELL, J.B. and SIMMONDS, A.J. (2009). Alternative requirements for Vestigial, Scalloped, and Dmef2 during muscle differentiation in Drosophila melanogaster. *Mol Biol Cell* 20: 256-69.
- DESHPANDE, N., CHOPRA, A., RANGARAJAN, A., SHASHIDHARA, L.S., RODRIGUES, V. and KRISHNA, S. (1997). The human transcription enhancer factor-1, TEF1, can substitute for Drosophila scalloped during wingblade development. *J Biol Chem* 272: 10664-8.
- DJIANE, A., ZAESSINGER, S., BABAOGLAN, A.B. and BRAY, S.J. (2014). Notch inhibits yorkie activity in Drosophila wing discs. *PLoS One* 9: e106211.
- FAUCHEUX, C., NAYE, F., TREGUER, K., FEDOU, S., THIEBAUD, P. and THEZE, N. (2010). Vestigial like gene family expression in Xenopus: common and divergent features with other vertebrates. *Int J Dev Biol* 54: 1375-82.
- FRISTROM, D. (1969). Cellular degeneration in the production of some mutant phenotypes in Drosophila melanogaster. *Mol Gen Genet* 103: 363-79.
- GAMBARO, K., QUINN, M.C., WOJNAROWICZ, P.M., ARCAND, S.L., DE LADURANTAYE, M., BARRES, V., RIPEAU, J.S., KILLARY, A.M., DAVIS, E.C., LAVOIE, J. *et al.* (2013). VGLL3 expression is associated with a tumor suppressor phenotype in epithelial ovarian cancer. *Mol Oncol* 7: 513-30.
- GARCIA-BELLIDO, A. (1975). Genetic control of wing disc development in Drosophila. *Ciba Found Symp* 0: 161-82.

- GAT-YABLONSKI, G., FRUMKIN-BEN DAVID, R., BAR, M., POTIEVSKY, O., PHILLIP, M. and LAZAR, L. (2011). Homozygous microdeletion of the POU1F1, CHMP2B, and VGLL3 genes in chromosome 3--a novel syndrome. *Am J Med Genet A* 155A: 2242-6.
- GUNTHER, S., MIELCAREK, M., KRUGER, M. and BRAUN, T. (2004). VITO-1 is an essential cofactor of TEF1-dependent muscle-specific gene regulation. *Nucleic Acids Res* 32: 791-802.
- GUO, T., LU, Y., LI, P., YIN, M.X., LV, D., ZHANG, W., WANG, H., ZHOU, Z., JI, H., ZHAO, Y. *et al.* (2013). A novel partner of Scalloped regulates Hippo signaling via antagonizing Scalloped-Yorkie activity. *Cell Res* 23: 1201-14.
- HALDER, G. and CARROLL, S.B. (2001). Binding of the Vestigial co-factor switches the DNA-target selectivity of the Scalloped selector protein. *Development* 128: 3295-305.
- HALDER, G., POLACZYK, P., KRAUS, M.E., HUDSON, A., KIM, J., LAUGHON, A. and CARROLL, S. (1998). The Vestigial and Scalloped proteins act together to directly regulate wing-specific gene expression in Drosophila. *Genes Dev* 12: 3900-9.
- HALLOR, K.H., SCIOT, R., STAAF, J., HEIDENBLAD, M., RYDHOLM, A., BAUER, H.C., ASTROM, K., DOMANSKI, H.A., MEIS, J.M., KINDBLOM, L.G. *et al.* (2009). Two genetic pathways, t(1;10) and amplification of 3p11-12, in myxoinflammatory fibroblastic sarcoma, haemosiderotic fibrolipomatous tumour, and morphologically similar lesions. *J Pathol* 217: 716-27.
- HALPERIN, D.S., PAN, C., LUSIS, A.J. and TONTONNOZ, P. (2013). Vestigial-like 3 is an inhibitor of adipocyte differentiation. *J Lipid Res* 54: 473-81.
- HAMADE, A., RIZK, F. and COUSIN, X. (2013a). Comparative expression pattern of two vestigial-like 2 genes in zebrafish. *Bioengineering and Biosciences* 1: 11-16.
- HAMADE, A., RIZK, F., GENET, C. and COUSIN, X. (2013b). Comparative expression pattern of two vestigial-like 2 genes in zebrafish. *Bioengineering and Biosciences* 1: 11-16.
- HARVEY, K.F., ZHANG, X. and THOMAS, D.M. (2013). The Hippo pathway and human cancer. *Nat Rev Cancer* 13: 246-57.
- HELIAS-RODZEWICZ, Z., PEROT, G., CHIBON, F., FERREIRA, C., LAGARDE, P., TERRIER, P., COINDRE, J.M. and AURIAS, A. (2010). YAP11 and VGLL3, encoding two cofactors of TEAD transcription factors, are amplified and overexpressed in a subset of soft tissue sarcomas. *Genes Chromosomes Cancer* 49: 1161-71.
- HOEGG, S., BRINKMANN, H., TAYLOR, J.S. and MEYER, A. (2004). Phylogenetic timing of the fish-specific genome duplication correlates with the diversification of teleost fish. *J Mol Evol* 59: 190-203.
- JACQUEMIN, P. and DAVIDSON, I. (1997). The Role of the TEF Transcription Factors in Cardiogenesis and Other Developmental Processes. *Trends Cardiovasc Med* 7: 192-7.
- JAILLON, O., AURY, J.M., BRUNET, F., PETIT, J.L., STANGE-THOMANN, N., MAUCELI, E., BOUNEAU, L., FISCHER, C., OZOUF-COSTAZ, C., BERNOT, A. *et al.* (2004). Genome duplication in the teleost fish Tetraodon nigroviridis reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature* 431: 946-57.
- JIANG, W., YAO, F., HE, J., LV, B., FANG, W., ZHU, W., HE, G. and CHEN, J. (2014). Downregulation of VGLL4 in the progression of esophageal squamous cell carcinoma. *Tumour Biol* 36: 1289-97.
- JIAO, S., WANG, H., SHI, Z., DONG, A., ZHANG, W., SONG, X., HE, F., WANG, Y., ZHANG, Z., WANG, W. *et al.* (2014). A peptide mimicking VGLL4 function acts as a YAP1 antagonist therapy against gastric cancer. *Cancer Cell* 25: 166-80.
- JIN, H.S., PARK, H.S., SHIN, J.H., KIM, D.H., JUN, S.H., LEE, C.J. and LEE, T.H. (2011). A novel inhibitor of apoptosis protein (IAP)-interacting protein, Vestigial-like (Vgl)-4, counteracts apoptosis-inhibitory function of IAPs by nuclear sequestration. *Biochem Biophys Res Commun* 412: 454-9.

- JOHNSON, C.W., HERNANDEZ-LAGUNAS, L., FENG, W., MELVIN, V.S., WILLIAMS, T. and ARTINGER, K.B. (2011). Vgll2a is required for neural crest cell survival during zebrafish craniofacial development. *Dev Biol* 357: 269-81.
- KIM, J., SEBRING, A., ESCH, J.J., KRAUS, M.E., VORWERK, K., MAGEE, J. and CARROLL, S.B. (1996). Integration of positional signals and regulation of wing formation and identity by *Drosophila* vestigial gene. *Nature* 382: 133-8.
- KLEIN, T. and MARTINEZ ARIAS, A. (1999). The vestigial gene product provides a molecular context for the interpretation of signals during the development of the wing in *Drosophila*. *Development* 126: 913-925.
- KOONTZ, L.M., LIU-CHITTENDEN, Y., YIN, F., ZHENG, Y., YU, J., HUANG, B., CHEN, Q., WU, S. and PAN, D. (2013). The Hippo effector Yorkie controls normal tissue growth by antagonizing scalloped-mediated default repression. *Dev Cell* 25: 388-401.
- KURRASCH, D.M., CHEUNG, C.C., LEE, F.Y., TRAN, P.V., HATA, K. and INGRAHAM, H.A. (2007). The neonatal ventromedial hypothalamus transcriptome reveals novel markers with spatially distinct patterning. *J Neurosci* 27: 13624-34.
- LAGHA, M., SATO, T., REGNAULT, B., CUMANO, A., ZUNIGA, A., LICHT, J., RELAIX, F. and BUCKINGHAM, M. (2010). Transcriptome analyses based on genetic screens for Pax3 myogenic targets in the mouse embryo. *BMC Genomics* 11: 696.
- LI, H., WANG, Z., ZHANG, W., QIAN, K., LIAO, G., XU, W. and ZHANG, S. (2015a). VGLL4 inhibits EMT in part through suppressing Wnt/beta-catenin signaling pathway in gastric cancer. *Med Oncol* 32: 83.
- LI, N., YU, N., WANG, J., XI, H., LU, W., XU, H., DENG, M., ZHENG, G. and LIU, H. (2015b). miR-222/VGLL4/YAP1-TEAD1 regulatory loop promotes proliferation and invasion of gastric cancer cells. *Am J Cancer Res* 5: 1158-68.
- MAEDA, T., CHAPMAN, D.L. and STEWART, A.F. (2002). Mammalian vestigial-like 2, a cofactor of TEF-1 and MEF2 transcription factors that promotes skeletal muscle differentiation. *J Biol Chem* 277: 48889-98.
- MANN, C.J., OSBORN, D.P. and HUGHES, S.M. (2007). Vestigial-like-2b (VITO-1b) and Tead-3a (Tef-5a) expression in zebrafish skeletal muscle, brain and notochord. *Gene Expr Patterns* 7: 827-36.
- MANN, K.M., WARD, J.M., YEW, C.C., KOVOCHICH, A., DAWSON, D.W., BLACK, M.A., BRETT, B.T., SHEETZ, T.E., DUPUY, A.J., AUSTRALIAN PANCREATIC CANCER GENOME, I. et al. (2012). Sleeping Beauty mutagenesis reveals cooperating mutations and pathways in pancreatic adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 5934-41.
- MANN, R.S. and CARROLL, S.B. (2002). Molecular mechanisms of selector gene function and evolution. *Curr Opin Genet Dev* 12: 592-600.
- MELVIN, V.S., FENG, W., HERNANDEZ-LAGUNAS, L., ARTINGER, K.B. and WILLIAMS, T. (2013). A morpholino-based screen to identify novel genes involved in craniofacial morphogenesis. *Dev Dyn* 242: 817-31.
- MIELCAREK, M., GUNTHER, S., KRUGER, M. and BRAUN, T. (2002). VITO-1, a novel vestigial related protein is predominantly expressed in the skeletal muscle lineage. *Mech Dev* 119 Suppl 1: S269-74.
- MIELCAREK, M., PIOTROWSKA, I., SCHNEIDER, A., GUNTHER, S. and BRAUN, T. (2009). VITO-2, a new SID domain protein, is expressed in the myogenic lineage during early mouse embryonic development. *Gene Expr Patterns* 9: 129-37.
- NIRO, C., DEMIGNON, J., VINCENT, S., LIU, Y., GIORDANI, J., SGARIOTO, N., FAVIER, M., GUILLET-DENIAU, I., BLAIS, A. and MAIRE, P. (2010). Six1 and Six4 gene expression is necessary to activate the fast-type muscle gene program in the mouse primary myotome. *Dev Biol* 338: 168-82.
- PANOPOULOU, G., HENNIG, S., GROTH, D., KRAUSE, A., POUSTKA, A.J., HERWIG, R., VINGRON, M. and LEHRACH, H. (2003). New evidence for genome-wide duplications

- at the origin of vertebrates using an amphioxus gene set and completed animal genomes. *Genome Res* 13: 1056-66.
- PAUMARD-RIGAL, S., ZIDER, A., VAUDIN, P. and SILBER, J. (1998). Specific interactions between vestigial and scalloped are required to promote wing tissue proliferation in *Drosophila melanogaster*. *Dev Genes Evol* 208: 440-6.
- PENG, Z., SKOOG, L., HELLBORG, H., JONSTAM, G., WINGMO, I.L., HJALMERIKSSON, M., HARMENBERG, U., CEDERMARK, G.C., ANDERSSON, K., AHRLUND-RICHTER, L. *et al.* (2014). An expression signature at diagnosis to estimate prostate cancer patients' overall survival. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 17: 81-90.
- POBBATI, A.V., CHAN, S.W., LEE, I., SONG, H. and HONG, W. (2012). Structural and functional similarity between the Vgll1-TEAD and the YAP1-TEAD complexes. *Structure* 20: 1135-40.
- POBBATI, A.V. and HONG, W. (2013). Emerging roles of TEAD transcription factors and its coactivators in cancers. *Cancer Biol Ther* 14: 390-8.
- ROSENFELD, J.A., AMROM, D., ANDERMANN, E., ANDERMANN, F., VEILLEUX, M., CURRY, C., FISHER, J., DEPUTY, S., AYLSWORTH, A.S., POWELL, C.M. *et al.* (2012). Genotype-phenotype correlation in interstitial 6q deletions: a report of 12 new cases. *Neurogenetics* 13: 31-47.
- SALICHS, E., LEDDA, A., MULARONI, L., ALBA, M.M. and DE LA LUNA, S. (2009). Genome-wide analysis of histidine repeats reveals their role in the localization of human proteins to the nuclear speckles compartment. *PLoS Genet* 5: e1000397.
- SEBE-PEDROS, A., ZHENG, Y., RUIZ-TRILLO, I. and PAN, D. (2012). Premetazoan origin of the hippo signaling pathway. *Cell Rep* 1: 13-20.
- SIMMONDS, A.J., LIU, X., SOANES, K.H., KRAUSE, H.M., IRVINE, K.D. and BELL, J.B. (1998). Molecular interactions between Vestigial and Scalloped promote wing formation in *Drosophila*. *Genes Dev* 12: 3815-20.
- SUDARSAN, V., ANANT, S., GUPTAN, P., VIJAYRAGHAVAN, K. and SKAER, H. (2001). Myoblast diversification and ectodermal signaling in *Drosophila*. *Dev Cell* 1: 829-39.
- TAJONAR, A., MAEHR, R., HU, G., SNEDDON, J.B., RIVERA-FELICIANO, J., COHEN, D.E., ELLEDGE, S.J. and MELTON, D.A. (2013). VGLL4 is a Novel Regulator of Survival in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*.
- TAYLOR, J.S., BRAASCH, I., FRICKEY, T., MEYER, A. and VAN DE PEER, Y. (2003). Genome duplication, a trait shared by 22000 species of ray-finned fish. *Genome Res* 13: 38290.
- VAUDIN, P., DELANOUE, R., DAVIDSON, I., SILBER, J. and ZIDER, A. (1999). TONDU (TDU), a novel human protein related to the product of vestigial (vg) gene of *Drosophila melanogaster* interacts with vertebrate TEF factors and substitutes for Vg function in wing formation. *Development* 126: 4807-16.
- WANG, W.Z., GUO, X., DUAN, C., MA, W.J., ZHANG, Y.G., XU, P., GAO, Z.Q., WANG, Z.F., YAN, H., ZHANG, Y.F. *et al.* (2009). Comparative analysis of gene expression profiles between the normal human cartilage and the one with endemic osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 17: 83-90.
- WILLIAMS, J.A., ATKIN, A.L. and BELL, J.B. (1990). The functional organization of the vestigial locus in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and General Genetics* 221: 8-16.
- WILLIAMS, J.A. and BELL, J.B. (1988). Molecular organization of the vestigial region in *Drosophila melanogaster*. *Embo J* 7: 1355-63.
- WILLIAMS, J.A., BELL, J.B. and CARROLL, S.B. (1991). Control of *Drosophila* wing and haltere development by the nuclear vestigial gene product. *Genes Dev* 5: 2481-95.
- WILLIAMS, J.A., PADDOCK, S.W. and CARROLL, S.B. (1993). Pattern formation in a secondary field: a hierarchy of regulatory genes subdivides the developing *Drosophila* wing disc into discrete subregions. *Development* 117: 571-84.

- WILLIAMS, J.A., PADDOCK, S.W., VORWERK, K. and CARROLL, S.B. (1994). Organization of wing formation and induction of a wing-patterning gene at the dorsal/ventral compartment boundary. *Nature* 368: 299-305.
- WU, S., LIU, Y., ZHENG, Y., DONG, J. and PAN, D. (2008). The TEAD/TEF family protein Scalloped mediates transcriptional output of the Hippo growth-regulatory pathway. *Dev Cell* 14: 388-98.
- XIAO, J.H., DAVIDSON, I., MATTHES, H., GARNIER, J.M. and CHAMBON, P. (1991). Cloning, expression, and transcriptional properties of the human enhancer factor TEF-1. *Cell* 65: 551-68.
- ZHANG, L., REN, F., ZHANG, Q., CHEN, Y., WANG, B. and JIANG, J. (2008). The TEAD/TEF family of transcription factor Scalloped mediates Hippo signaling in organ size control. *Dev Cell* 14: 377-87.
- ZHANG, W., GAO, Y., LI, P., SHI, Z., GUO, T., LI, F., HAN, X., FENG, Y., ZHENG, C., WANG, Z. *et al.* (2014). VGLL4 functions as a new tumor suppressor in lung cancer by negatively regulating the YAP1-TEAD transcriptional complex. *Cell Res* 24: 331-43.
- ZIDER, A., FLAGIELLO, D., FROUIN, I. and SILBER, J. (1996). Vestigial gene expression in *Drosophila melanogaster* is modulated by the dTMP pool. *Mol Gen Genet* 251: 91-8.

Figure Legends

Fig. 1. Schematic representation of the eukaryotic tree of life showing the distribution of *Vestigial-like* and *TEAD* gene family members. The tree is based on the current view of phylogeny (Adoutte *et al.*, 2000, Delsuc *et al.*, 2006). The presence of *Vestigial-like* and *TEAD* genes is indicated for each species according to published data and genomic sequences retrieved from databases. * Only partial sequences. *Vg*, Vestigial; *Vgll*, Vestigial-like; *Vgll-4l*, Vestigial-like-4-like; *Sd*, Scalloped; *TEAD*, TEA Domain containing protein, TDU, Tondu domain; *Tgi*, TONDUdomain-containing Growth Inhibitor. D, Deuterostomes; O, Opisthokonts; P, Protostomes; V, Vertebrates. Representative species are: frog (*Xenopus laevis*), Fish (*Danio rerio*), Ascidian (*Ciona intestinalis*), Lancelet (*Branchiostoma floridae*), Sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*), Fly (*Drosophila melanogaster*), Worm (*Trichinella spiralis*), Annelid (*Capitella capitata*), Oyster (*Crassostrea gigas*), Sea anemone (*Nematostela vectensis*), Sponge (*Amphimedon queenslandica*), Protist (*Capsaspora owczarzaki*), Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), Amibe (*Acanthamoeba castellanii*).

Fig. 2. Syntenic organization of vertebrate *Vestigial-like* genes. Human, mouse, chicken, *Xenopus* and zebrafish chromosome regions containing *Vestigial-like* genes family members are depicted. Genes are represented as colored boxes with the arrow indicating the orientation of the transcription unit. Boxes of the same color correspond to ortholog genes. To avoid complexity, no scale is used here. For *Xenopus* genes, synteny was deduced from *Xenopus tropicalis* version 7.1 and *Xenopus laevis* version 6.0 or 7.2 as follows; *Vgll1*, sca_8 and sca_12933; *Vgll2* sca_5 and sca_275342; *Vgll3*, Sca_2 and sca_1709; *Vgll4*, sca_467 and sca_62870.

Fig. 3. Schematic diagram showing the genomic structure of *Vestigial-like* gene family members in representative species. Exons and introns are shown using box and solid lines respectively. Coding sequences are represented by colored boxes and untranslated regions by white boxes. The size of the coding regions, in nucleotides, are shown in scale above each exon. Intronic regions and untranslated regions are not drawn to scale. The size of genes is indicated on the right. The Tondu domains are shown in red and exons containing Tondu domains are shown in yellow. Exons containing translation initiation sites are black, with the 5' untranslated region shown in white. For *VGLL1-3* and *vg*, exons containing the 3' untranslated region are shown in blue. PPxY motifs in fly, oyster and sponge *tgi* are indicated by blue dots.

Fig. 4. Schematic representation and alignment of representative members of the Vestigial-like protein family. **A:** Schematic representation of human (VGLL1, VGLL2, VGLL3, VGLL4A and VGLL4B) and *Drosophila* (Vg, TgiRA, TgiRB) proteins. VGLL4A, VGLL4B, TgiRA and TgiRB are alternative forms of proteins generated from alternative promoters. The size of the proteins, in amino acids, is indicated above and the position and size of the Tondu domains (indicated in red) are drawn to scale. The position of PPxY motif is indicated by a blue box. **B:** Sequence comparison of the TDU domain from the Vgll1-3/Vg subfamily from different species. Comparison has been made with the human VGLL1 TDU domain. **C:** Sequence comparison between TDU1 and TDU2 from the Vgll4/Tgi subfamily from different species. The conserved V-D/ED/E-HF sequence at the core of the TDU domains has been highlighted in gray. Comparison has been made with the TDU1 and TDU2 of human VGLL4. Dots indicate identical amino acids residues. **D:** Ribbon diagram representation of the Vgll1/TEAD4 structure. The interaction between the two proteins is divided into two interfaces (grey shaded). TEAD4 is colored red, and Vgll1 is colored green (Pobbati *et al.*, 2012).

Fig. 5. Models for the function of VGLL4/Tgi as a new component of the Hippo pathway. Yorkie (Yki) in *Drosophila* or YAP1 in vertebrates are the effectors of the Hippo signaling (Hpo) with Scalloped (Sd) in *Drosophila* or TEAD in vertebrates, respectively. **A: Model 1.** When Hpo signaling is on, Yki/YAP1 is phosphorylated and cytoplasmic. The nuclear Tgi/VGLL4 can bind to Sd/TEAD and repress gene targets. According to data in *Drosophila*, additional Sd corepressors (protein X) likely exist. In the absence of Hpo signaling, Yki/YAP1 is nuclear and activate gene targets through Sd/TEAD binding. Model adapted from (Guo *et al.*, 2013, Koontz *et al.*, 2013) **B: Model 2.** Tgi forms a trimeric complex with Yki and Sd in which Tgi-Yki interaction is as important as Tgi-Sd interaction. When Hpo signaling is on, Tgi competes with Yki for Sd binding and leads to an inactivation of Sd/Yki transcriptional activity while Tgi simultaneously interacts with Yki resulting in its nuclear retention and dysfunction (Dashed red arrow). In the absence of Hpo signaling or when Yki is overexpressed, Yki nuclear concentration increases and can compete efficiently in a concentration dependent manner with Tgi to activate gene targets through Sd binding. Model adapted from (Guo *et al.*, 2013, Koontz *et al.*, 2013).

Table 1: Inventory of Vestigial-like gene family members in vertebrates and *Drosophila*. Standardized names are displayed according to nomenclature guidelines. The name given after identification through cDNA or gene cloning is indicated below in blue with corresponding references. Unreferenced genes (*) have been identified in databases and show synteny conservation. *SdbP* (Scalloped-Binding-Protein), *tgi* (TONDU-domain-containing Growth Inhibitor), *vg* (vestigial), *Vgl* and *Vgll* (vestigiallike), *VITO* (vestigial and Tondu-related). (1) (Williams and Bell, 1988), (2) (Koontz *et al.*, 2013), (3) (Guo *et al.*, 2013), (4) (Vaudin *et al.*, 1999), (5) (Maeda *et al.*,

2002), (6) (Mielcarek et al., 2002), (7) (Mielcarek et al., 2009), (8) (Chen et al., 2004b), (9) (Bonnet et al., 2010), (10) (Faucheux et al., 2010), (11) (Barrionuevo et al., 2014), (12) (Mann et al., 2007), (13) (Melvin et al., 2013). Guidelines for nomenclature in the different species are as follows: *Drosophila* (www.flybase.org); human (www.genename.org); mouse (www.informatics.jax.org); chicken (www.birdgenenames.org); *Xenopus* (www.xenbase.org) and zebrafish (www.zfin.org). Following the guidelines, genes are printed in italics but not proteins.

Table 2: Comparison of expression patterns of *Vestigial-like* genes in vertebrates. The expression of the different genes in adult tissues or embryo has been compiled from the following studies: (1) (Maeda et al., 2002), (2) (Chen et al., 2004b), (3) (Mielcarek et al., 2002), (4) (Mielcarek et al., 2009), (5) (Bonnet et al., 2010), (6) (Faucheux et al., 2010), (7) (Barrionuevo et al., 2014), (8) (Mann et al., 2007). * EST profile data have been obtained from the following sources: chicken VGLL1 (BBGG19426), VGLL4 (BB-GG19430); Embryonic expression is shown in italics. Sk., Skeletal.

Figure 1

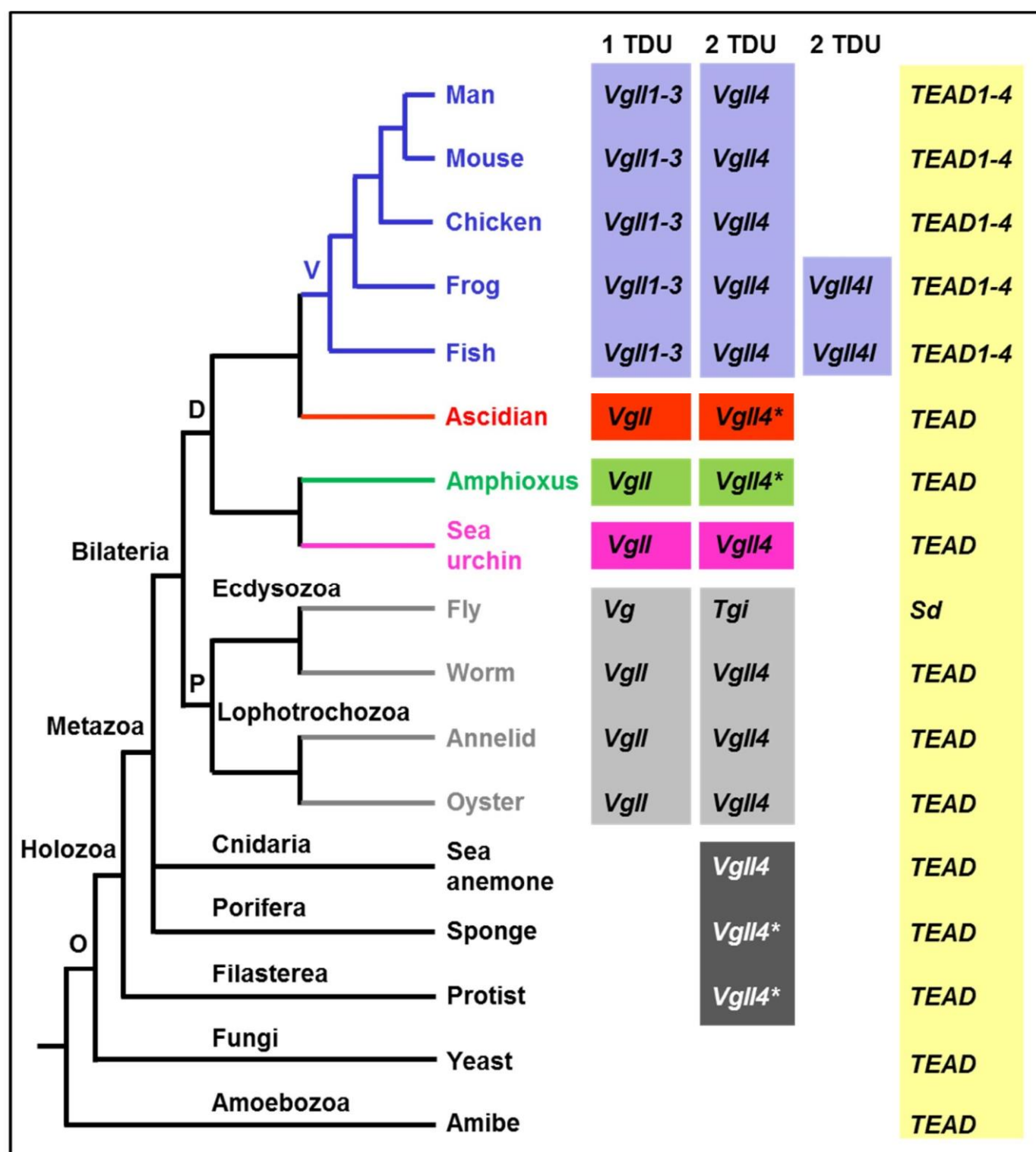


Figure 2

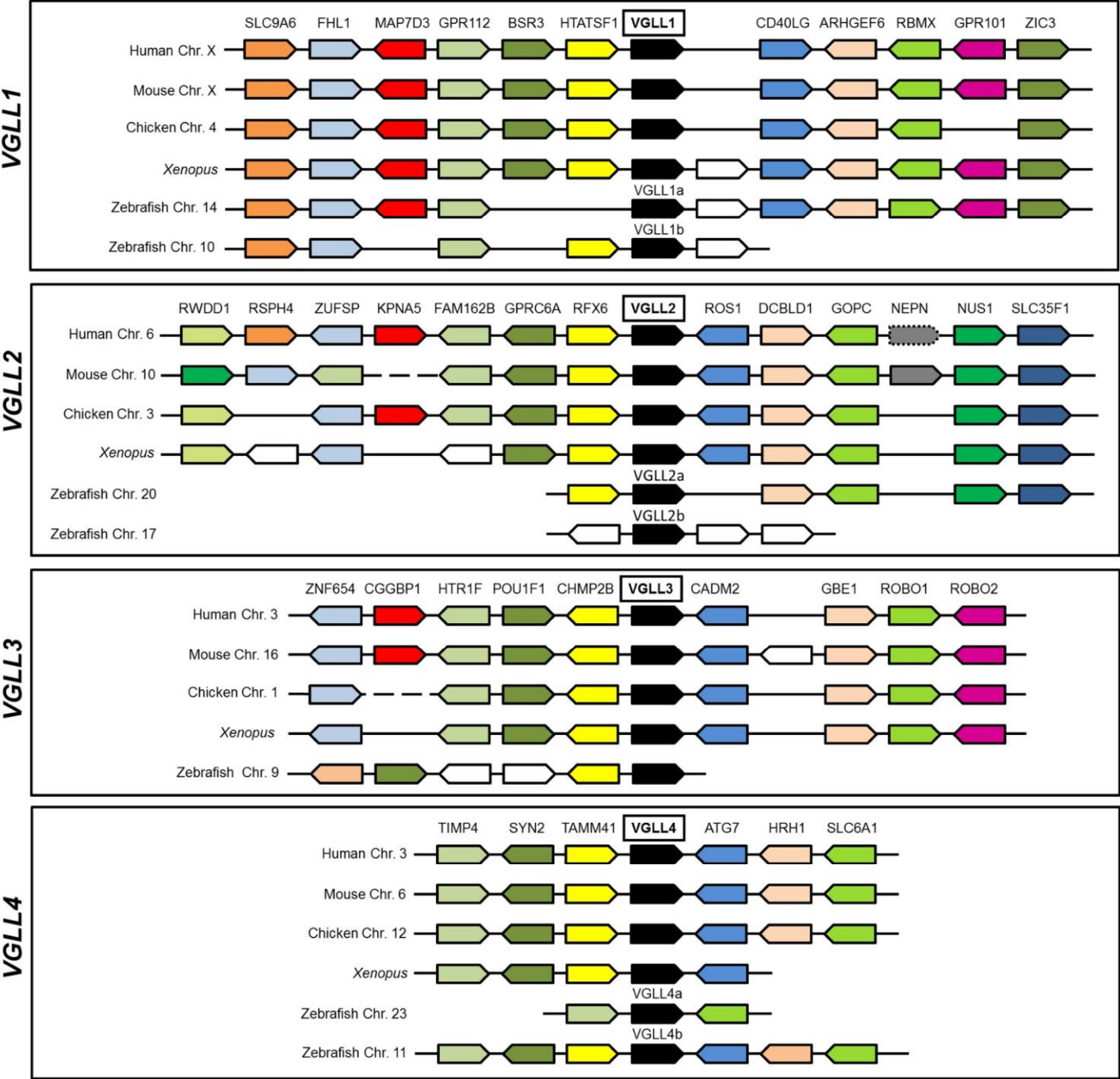


Figure 3

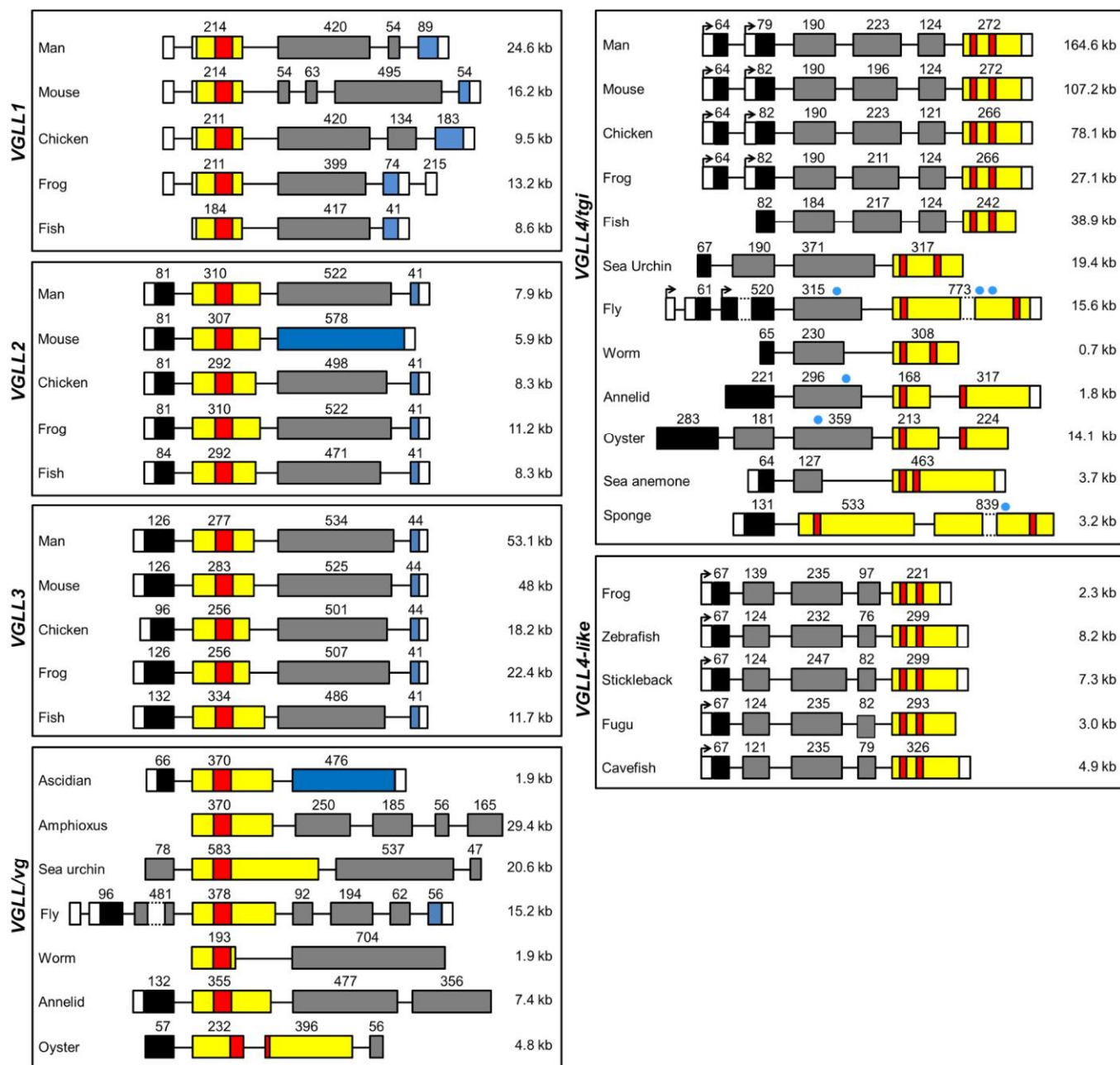


Figure 4

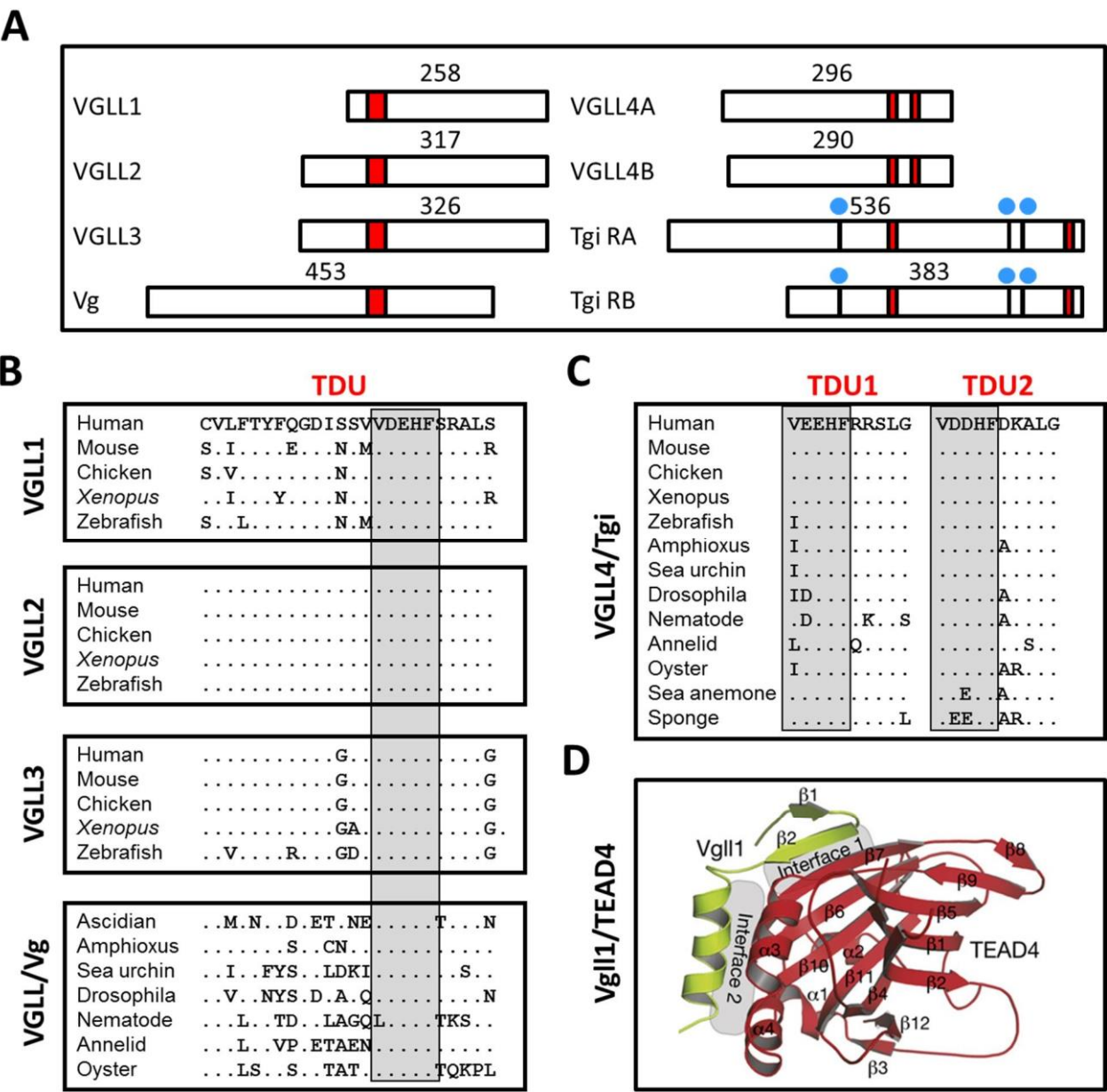


Figure 5

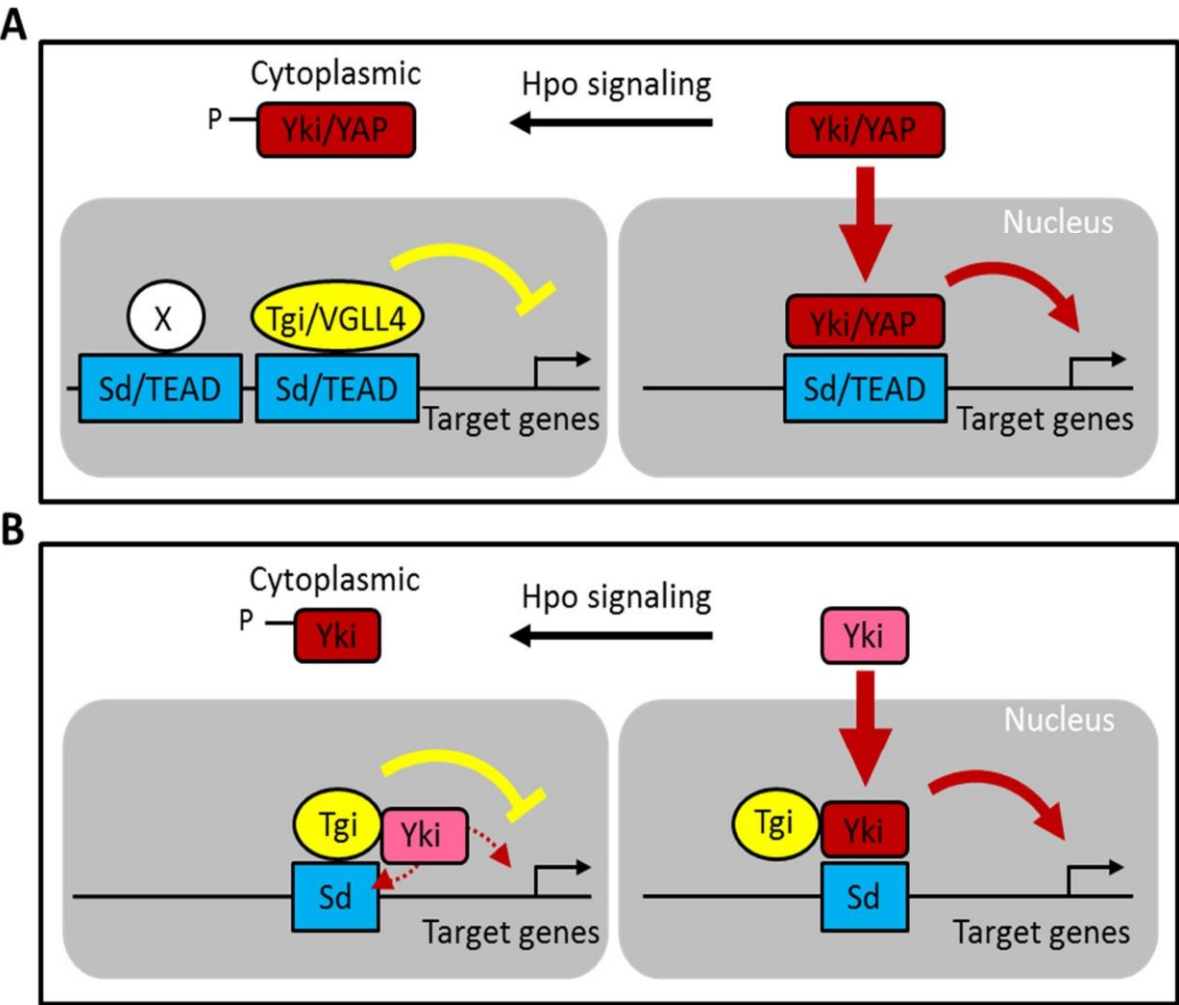


Table 1

Nomenclature					
<i>Drosophila</i>		<i>vg/Vg</i> (1)		<i>tgi/ Tgi</i> (2) <i>SdBP</i> (3)	
Human	<i>VGLL1/VGLL1</i> <i>TONDU</i> (4)	<i>VGLL2/VGLL2</i> <i>Vgl-2</i> (5), <i>VITO-1</i> (6)	<i>VGLL3/VGLL3</i> <i>Vgl-3</i> (5), <i>VITO-2</i> (7)	<i>VGLL4/VGLL4</i> <i>Vgl-4</i> (8)	
Mouse	<i>Vgl1/VGLL1</i> <i>Vgl-1</i> (5)	<i>Vgl2/VGLL2</i> <i>Vgl-2</i> (5), <i>VITO-1</i> (6)	<i>Vgl3/VGLL3</i> <i>Vgl-3</i> (5), <i>VITO-2</i> (7)	<i>Vgl4/VGLL4</i> <i>Vgl-4</i> (8)	
Chicken	<i>VGLL1/VGLL1*</i>	<i>VGLL2/VGLL2</i> <i>Vgl-2</i> (9)	<i>VGLL3/VGLL3*</i>	<i>VGLL4/VGLL4*</i>	
<i>Xenopus</i>	<i>vgl1/Vgl1</i> (10)	<i>vgl2/Vgl2</i> (10)	<i>vgl3/Vgl3</i> (10)	<i>vgl4/Vgl4</i> (10)	<i>vgl4l/Vgl4l</i> (11)
Zebrafish	<i>vgl1/Vgl1*</i>	<i>vgl2/Vgl2</i> <i>vgl-2a, vgl-2b</i> (12)	<i>vgl3/Vgl3*</i>	<i>vgl4/Vgl4</i> (13)	<i>vgl4l/Vgl4l</i> (13)

Table 2

Gene	<i>VGLL1</i>	<i>VGLL2</i>	<i>VGLL3</i>	<i>VGLL4</i>
Human (1-4)	Placenta	Sk. muscle	Placenta	Heart, kidney, brain, placenta, lung, intestine, spleen, Sk. muscle, liver
Mouse (2-4)		<i>Pharyngeal arches, somites, hypothalamus</i> Sk. muscle	<i>Somites, midbrain</i> Sk. muscle, brain, kidney	
Chicken (5)	Head*	<i>Somites, head muscle, limb muscle</i>		Bursa of Fabricius*, epiphyseal*, limb*, intestine*, brain*
<i>Xenopus</i> (6,7)	<i>Epidermis</i>	<i>Somites, head muscles, hypaxial muscle</i>	<i>Hindbrain</i>	<i>Brain, eyes, branchial arches, somites</i>
	Skin	Sk. muscle, brain	Stomach, heart, brain	Ovary*, stomach*, brain*, heart*, liver*, skin*, kidney*, testis*
Zebrafish (8)		<i>Somites</i>		

Annexe 2 : Matériels et Méthodes

I. Méthodes de préparation

A. Clonages moléculaires

1. Constructions plasmidiques pour la production d'ARNm

Les sous-clonages des différents ADNc d'intérêts dans les vecteurs plasmidiques sont réalisés à partir d'ARN total d'embryons et après une étape de RT-PCR ou, dans le cas de constructions plasmidiques préexistantes après une étape d'amplification par PCR. Les amorces utilisées (Tableau 8), dans les étapes de RT-PCR contiennent des sites de restriction afin de permettre l'insertion de l'ADNc dans les vecteurs. Les vecteurs utilisés sont pCS2-flag, pCS2-HA et pCS2-Myc. Ils possèdent plusieurs promoteurs (SP6, T7 et T3) permettant la synthèse d'ARNm ou d'ARN antisens utilisé pour l'hybridation *in situ*.

Nom de l'ADNc	Amorces de 5' en 3'
Vgll4 muté	TDU1 sens : GACCCTGTGGTGGCAGCGGCGGCACGCAGAAGTCTCTG
	TDU1 antisens : ACAGGCAGTCGTAGTGTTCGATGGC
	TDU2 sens : CCGGTTTCGGTTGCTGCCGCTGCAGCCAAGGCCCTTG
	TDU2 antisens : TGATAGACACAGAATTGGCAACGGG
Vgll4-LB	sens : GCGC GGATCC GCTCCGACCCAAACAAACAGC
	antisens : GCGC TCTAGAG CTTCGTGGAAGCATCCAGTCTG
Vgll4-SA	sens : CGCG GGATCC ATGCTCTGTGTGAAGATGGA
	antisens : CGCG TCTAGA AGAGAGGACAGACGGGGAGT
Vgll4-EnR	sens : CAGATACA ATCGAT ATGCTCGCTCGACCATGGAC
	antisens : CGCG GAATTC GGGAGAGGACGGAGGGGAGT
Vgll4-VP16	sens : CGCG TCTGAG ATGCTCTCGCTCTGACCATGGAC
	antisens : CGCG TCTAGAG GAGAGGACGGATGGGGGT
Vgll4 delta 86N	sens : CGCG GGATCC ATGTTTGCTCCGCACATAAC
	antisens : GCGC TCTAGAG GAGAGGACGGATGGGGGAG
Vgll4 delta 145N	sens : CGCG GGATCC ATGGATGCTTCACGCAT
	antisens : GCGC TCTAGAG GAGAGGACGGATGGGGGAG
Vgll4 delta 222N	sens : CGCG GGATCC CAAGATGTACAAGGAACCGG
	antisens : GCGCTCTAGAGGAGAGGACGGATGGGGGAG
Vgll4 delta 122C	sens : GCGC GGATCC ATGCTCGCTCTGACCATGGAC
	antisens : CGCG TCTAGAA CTCATGGTCGGCGCTGC
Vgll4 delta 193C	sens : GCGC GGATCC ATGCTCGCTCTGACCATGGAC
	antisens : CGCG TCTAGAG GCACAACCACTG
Vgll4 delta 222C	sens : GCGC GGATCC ATGCTCGCTCTGACCATGGAC
	antisens : CGCG TCTAGAC GGTTTCCTTGTAG
YAP1 65	sens : GCGC GAATTC ATGGAGGAGCCCGCTCCCAGCAAC
	antisens : GCGC TCTAGATA ACCACGTGAGAAAGCTTTCC
Tead1-Myc	sens : CGCG GGATCC ATGGAGCCGAGCAGTTGGAGCG
	antisens : CGCG ATCGATG ATCTTTAACAAGCCTGTAGATG

Tableau 8 : Récapitulatif de la séquence des amorces utilisées lors des sous-clonages. Les sites de restriction sont indiqués en gras

2. Construction du vecteur pCS2-HA

L'étiquette HA a été ajoutée par PCR au vecteur pCS2+ afin de produire des protéines étiquetées utilisées dans les analyses de western-blot et d'immunoprécipitation. La réaction de PCR a été réalisée à l'aide d'une amorce contenant l'étiquette HA (YPYDVPDYA) (Tableau 9). Le fragment obtenu a été purifié et cloné dans les sites Acc65I et XbaI dans le vecteur pCS2+.

	Amorces de 5' en 3'
pCS2-HA	sens : GCGC TCTAGA <u>TACCCATACGACGTCCCAGACTACGCT</u> TAGACTATAGTGAGTCGTATTACG TAG
	antisens : AATTAACCCTCACTAAAGGG

Tableau 9 : Séquences des amorces utilisées pour la construction du vecteur pCS2-HA.
Le site de restriction est indiqué en gras et la séquence de l'étiquette HA est soulignée.

3. Mutations des domaines Tondus de Vgll4

Les mutations dans les domaines Tondus (TDU) de Vgll4 ont été réalisées pour des expériences de gain de fonction à l'aide du kit Q5 Site-Directed Mutagenesis (Biolabs). Le protocole de mutagenèse comporte trois étapes. La première étape est une étape d'amplification par PCR réalisée avec des amorces contenant la mutation de la séquence souhaitée (Tableau 8, Vgll4 muté) dans les conditions suivantes (Tableau 10).

Etape	Température	Durée
Dénaturation	98°C	30 s
25 cycles	98°C	10 s
	65°C	30 s
	72°C	4 min
Extension finale	72°C	2 min

Tableau 10 : Conditions de PCR utilisées pour la construction des formes mutantes.

La deuxième étape permet, grâce à différentes enzymes telles qu'une kinase et une ligase de circulariser le produit PCR et d'éliminer la matrice d'ADN utilisée. La dernière étape correspond à la transformation du produit PCR dans des bactéries compétentes.

La mutagenèse des domaines Tondus a été effectuée séquentiellement, le plasmide contenant la mutation sur le premier domaine a servi de matrice pour réaliser la mutation du second domaine.

4. Identification des extrémités 5' des gènes *vgll3* et *vgll4-LB* par la technique de 5' RACE

Les régions 5'UTR des ARNm *vgll3* et *vgll4-LB* ont été obtenues par la technique de la 5'RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) à partir d'ARN total d'embryon et à l'aide du kit (5'/3' RACE Kit, 2nd Generation, Roche). Les ARN totaux sont déphosphorylés grâce à la CIP (Calf Intestinal Phosphatase) puis leur coiffe est éliminée grâce à la TAP (Tobacco Acid Pyrophosphatase). Un oligonucléotide est ajouté à l'extrémité 5' des ARNm en utilisant la T4 RNA ligase et une transcription

inverse est réalisée à partir d'une amorce spécifique des ARNm *vgll3* ou *vgll4* (amorce1, Tableau 11). L'ADNc est amplifié par PCR à l'aide d'une amorce spécifique de l'oligonucléotide situé en 5' et en amont de l'amorce 1 et d'une amorce spécifique des ARNm *vgll3* ou *vgll4* (amorce 2, Tableau 11). Le produit de PCR obtenu est cloné dans le plasmide pCR4-TOPO (Invitrogen®) puis séquencé pour vérification.

	Amorces de 5' en 3'
5'RACE Vgll4	amorce 1 : TTCTGCGAAAGTGCTCTTCC
	amorce 2 : AACCACTGTGGGTGACTGTG
5' RACE Vgll3	amorce 1 : CCACCACTGCTCCAATGTCTC
	amorce 2 : GATATTCCATCTCCGCAGGC

Tableau 11 : Séquences des amorces utilisées lors des expériences de 5'RACE

B. Transcription et traduction *in vitro*

1. Transcription *in vitro*

Les plasmides utilisés pour la transcription *in vitro* sont linéarisés par digestion enzymatique par l'enzyme *Acc65I*. Les plasmides linéarisés sont incubés 30 min à 50°C dans un tampon de lyse (20 mM Tris-HCl pH 8; 0,1% SDS et 10 mM EDTA) contenant 200 µg/ml de protéinase K (Promega). L'ADN est ensuite extrait par une solution de phénol/chloroforme/alcool isoamylique) (25/24/1) et une précipité à l'éthanol 100%.

La transcription *in vitro* est réalisée à l'aide du kit mMESSAGE mMACHINE® (Ambion), selon les recommandations du fournisseur. L'ARNm obtenu est dosé au spectrophotomètre et analysé par électrophorèse sur gel d'agarose 1% dans un tampon 1X TBE (90 mM Tris-Borate, 2 mM EDTA).

2. Traduction *in vitro*

Les ARNm coiffés (500 ng) sont traduits en lysat de réticulocytes de lapin en présence de méthionine ³⁵S, selon les recommandations du fournisseur (Promega). Les produits de traduction sont analysés par électrophorèse sur un gel dénaturant de polyacrylamide à 10%. Après migration, le gel est séché puis mis en autoradiographie toute la nuit.

C. Morpholinos

Les morpholinos (Mo) sont de courtes séquences de nucléotides couplées à des anneaux de morpholine. Ils sont utilisés dans les expériences de perte de fonction. Ils s'hybrident à l'extrémité 5' de l'ARNm dans la partie non traduite, et empêchent la traduction de l'ARNm cible. Les morpholinos ont été fournis par la société Gene tools et conçus pour reconnaître spécifiquement les différents ARNm. Les Mo sont repris dans de l'eau à une concentration de 2 mM (Tableau 12), dénaturés à 65°C pendant 5 min puis conservés à -20°C. La spécificité et l'efficacité des Mo sont vérifiées par traduction *in vitro* des ARNm cibles en leur présence ou non.

Morpholino	Séquences de 5' en 3'
Mo contrôle	CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA
Mo vgl4-LA	GGAGATGCGGCCCGGTAACAAAAG
Mo vgl4-LB	ACCATCCAACGGATTCTCCATTCT
Mo vgl4-S	GCAGATCCATCTTCACACAGAGCAT
Mo vgl4 mismatch	GGACATCCGCCCGCTAAAAAG
Mo vgl3	GGTGCCACTAGACAGCAGTTCTGCG
Mo Tead1	CTCCAAGTGCTCGGCTCCATGATTG
Mo Tead 2	AGGGTAAGGAGAGGCTCCTCCAAGC

Tableau 12 : Séquences des différents morpholinos utilisés. Le morpholino mismatch correspond à un morpholino dont la séquence en nucléotides a été modifiée pour qu'il ne puisse plus se fixer sur l'ARNm cible.

D. Manipulation des embryons de xénope

1. Obtention des embryons

Les xénopes adultes sont obtenus à l'élevage du CNRS de Rennes ou proviennent du stock center de Portsmouth. Les expériences réalisées à l'aide des embryons ont obtenues l'accord du comité d'éthique de Bordeaux.

Les embryons de xénope sont obtenus par fécondation *in vitro*. La veille, la ponte est stimulée par l'injection dans les sacs lymphatiques dorsaux de 750 unités d'HCG (Hormone chorionique gonadotrope, Chorulon ®). Les femelles sont placées à 20°C dans un milieu 1X MMR (100 mM NaCl ; 2 mM KCl ; 2mM CaCl₂ ; 1mM MgCl₂ ; 5mM HEPES; pH 7,6) et la ponte débute une quinzaine d'h après l'injection, les œufs pondus sont récupérés à intervalles réguliers.

Pour la fécondation *in vitro*, un mâle est sacrifié par immersion dans une solution de benzocaïne (2g/L). Les testicules sont prélevés par chirurgie et conservés à 4°C dans du 1X MMR. Un morceau de testicule est dilacéré à l'aide de pinces fines puis appliqué sur les œufs. Après 10 min, les œufs sont recouverts de 0,1X MMR, 10 min après l'application du testicule. Après 30 min à température ambiante (22°C), les œufs fécondés se retournent, le pôle animal tourné vers le haut. Les embryons sont dégangués dans une solution de 3% cystéine (Sigma) dans l'eau et à pH 7,5. Les

embryons sont rincés au minimum 5 fois avec une solution de 0,1X MMR et placés dans une solution de 5% Ficoll (Sigma) dans du 0,375X MMR pour les micro-injections.

2. Micro-injection

Les embryons sont micro-injectés à l'aide de capillaires d'un diamètre de 20 à 30 μm préparés à l'aide d'une étireuse Narishge PC-10. Les capillaires sont remplis avec une huile minérale colorée en rouge puis montés sur le micro-injecteur (Drumond nanoject) qui est réglé pour injecter des volumes de 9,2 nl. Les solutions d'ARN et d'ADN à injecter sont dans l'eau.

Les embryons sont placés dans des boîtes contenant des logettes dans un support en pâte à modeler et injectés au stade deux ou quatre cellules selon le type d'expérience. Une fois les injections terminées, les embryons sont placés pour la nuit à 13°C dans la solution de Ficoll, puis transférés dans une solution de 0,1X MMR et incubés à des températures variables selon le stade de développement désiré. Les quantités d'ARNm injectés varient de 20 pg à 2 ng. Pour les ADN plasmidiques, 50 pg sont injectés.

3. Micro-dissection des embryons

Les embryons de stade *blastula* (stade 9) ou *gastrula* (10.5) sont placés dans une solution de 0,75X MMR contenant 50 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicine (Sigma). Les dissections se font à l'aide de pinces ultrafines dans une boîte de pétri sur un fond d'agarose 1% dans de l'eau. La membrane vitelline est enlevée, puis la région autour du pôle animal est découpée afin d'obtenir l'explant de calotte animale. Pour les embryons de stade *gastrula*, les régions du mésoderme dorsal, ventral et latéral sont disséquées. Les explants sont fixés au stade désiré puis analysés.

E. Culture cellulaire et transfection

Les cellules embryonnaires de rein humain de la lignée HEK 293 sont ensemencées dans des plaques 24 puits à 5×10^4 cellules/ cm^2 dans du milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) contenant 5% de sérum de veau fœtal (Invitrogen) à 37°C et 3% CO_2 . Le lendemain, les cellules sont transfectées par les plasmides d'intérêts purifiés avec des colonnes Nucleobond® Xtra endotoxin-free (Macherey Nagel, Duren, Germany), en utilisant la solution X-treme gene (ratio 2:1, Roche). Le plasmide pRL-TK (Promega ; 500ng/puits) permet de normaliser l'efficacité de la transfection et les constructions pGL284LUC ou pGLMCATLUC (500ng/puits). Les cellules sont co-transfectées ou non en présence des plasmides exprimant TEAD1, Vgll3, ETS-1 ou Vgll3 Δ TDU (dont le domaine tondu est muté) clonés dans les vecteurs pCS2-myc ou pCS2-HA (500ng/puits). pGL284LUC contient un fragment de

284 pb du promoteur de l' α tropomyosine en amont du gène rapporteur de la luciférase dans le vecteur pGL3 (Promega). pGLMCATLUC contient ce même fragment de 284 pb mais dont le site MCAT est muté. Ces deux constructions plasmidiques ont été clonées précédemment (Pasquet et al., 2006). Tous les plasmides utilisés pour le protocole de transfection ont été Après 24 h de culture, les cellules sont lysées dans du tampon de lyse (Dual Luciferase Kit, Promega). L'activité de la luciférase est ensuite mesurée à l'aide du Varioskan® Flash (Thermo Fisher Scientific). L'activité relative de la luciférase est normalisée avec l'activité luciférase de la rénilla.

II. Méthodes analytiques

A. Hybridation *in situ*

L'effet de l'injection des ARNm ou des morpholinos sur l'expression de différents marqueurs a été analysé par hybridation *in situ*. Le principe de cette technique repose sur l'hybridation entre une sonde d'ARN antisens marqué à la digoxygénine et l'ARNm endogène du gène d'intérêt (Figure 65).

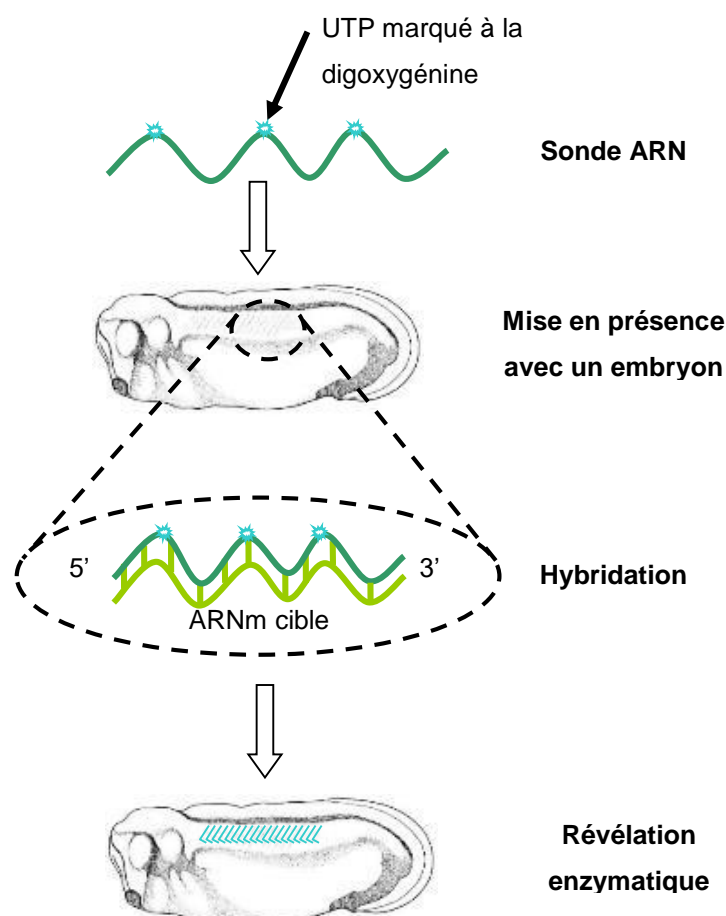


Figure 65 : Schématisation des différentes étapes de l'hybridation *in situ*

1. Préparation des sondes ARN antisens marquées à la digoxygénine

Les sondes sont obtenues par transcription *in vitro* à partir de 2 µg de matrice d'ADN linéarisé (Tableau) dans un volume total de 20 µl contenant 20 unités d'inhibiteur de RNase, 2 µl de DIG RNA labeling mix (Roche), 4 µl de tampon de transcription contenant 10 mM de DTT et 40 unités de RNA polymérase (Roche). Le mélange est incubé 2 h à 37°C. Après analyse de 2 µl sur gel d'agarose 1%, le mélange réactionnel est incubé 20 min à 37°C avec 20 unités de RQ1 DNase (Promega). Les transcrits sont précipités par addition 6 µl de 7,5M LiCl (Ambion) et 300 µl EtOH 100%. Après 20 min à -20°C le mélange est centrifugé et le culot est resuspendu dans 10 µl d'eau. La qualité des ARN est contrôlée par analyse d'1 µl sur gel d'agarose 1% puis l'ARN est repris dans 500 µl de tampon d'hybridation (50% formamide; 5X SSC; 1 mg/ml d'ARN de torula; 1X denhardt; 0,1% tween 20; 5 mM EDTA; 100 µg/ml héparine). Les sondes sont conservées à -80°C.

Nom du plasmide	Enzyme de restriction et polymérase pour la synthèse de l'ARN		Nom du plasmide	Enzyme de restriction et polymérase pour la synthèse de l'ARN	
	Sens	Antisens		Sens	Antisens
Elrc		HindIII/T7	p27 xic	AscI/Sp6	Sall/T7
En2-pBSKS	BamHI/T3	XhoI/T7	Slug-pCS107	AscI/Sp6	Sall/T7
Hairy 2A		Sall/T7	Sox2-pBSKS	EcoRV/T3	XbaI/T7
Krox20-pGEMT		EcoRI/T7	Sox9-pGEMT	SacI/T7	NcoI/Sp6
MyoD-pGEMT	SpeI/T7	NcoI/Sp6	Sox17-pBSKS	XhoI/T3	SmaI/T7
x-ngnr1a-pBSKS		BamHI/T3	Twist-pBSKS		XbaI/T7
XlNgn1-pCS2P	NotI/Sp6	EcoRI/T7	Vgll3-pCS105	XhoI/Sp6	BamHI/T7
N-tubulin-pBKS	EcoRI/T7	NcoI/T3	Xbra-pSp73		BglII/T7
Pax3-DH105	NotI/Sp6	Sall/T7	xK81-pGEMT	EcoRI/Sp6	BamHI/T7
Pax6-pCS2R	XhoI/Sp6	BglII/T7	Zic1-pCS2	Kpn/Sp6	EcoRI/T3

Tableau 13 : Enzymes utilisées pour la digestion des plasmides et pour la synthèse des ARN sens et des sondes antisens marquées à la digoxygénine.

2. Révélation de l'activité β-galactosidase

Le gène *LacZ* code la β-galactosidase dont l'activité est révélée en présence du substrat de l'enzyme; X-Gal® (6-chloro-3-indolyl-β-galactoside) donnant un produit coloré bleu ou red-Gal® donnant un produit coloré rouge. Les embryons sont fixés pendant 20 min dans une solution de MEMFA (100mM MOPS pH 7,4 ; 2 mM EGTA ; 1 mM MgSO₄ ; 3,7% formaldéhyde) puis lavés pendant 5x 5 min dans une solution 1X PBS/2mM MgCl₂ et placés dans la solution de coloration (20mM K₄Fe(CN)₆, 20mM K₃Fe(CN)₆, 2mM MgCl₂, 0,02% NP40, 0,4mg/ml X-Gal ou red-Gal). Une fois la coloration jugée satisfaisante, les embryons sont rincés dans une solution de 1X PBS/MgCl₂, puis refixés 1 h dans la solution de MEMFA et conservés dans du méthanol à -20°C.

3. Préparation des embryons

Toutes les étapes sont effectuées dans des tubes Eppendorf de 2 ml, à température ambiante et avec des volumes de 2 ml. Les embryons sont réhydratés par des lavages successifs :

- 1x 5 min dans 75% de méthanol : 25% d'eau,
- 1x 5 min dans 50% de méthanol : 50% d'eau,
- 1x 5 min dans 25% de méthanol : 75 % PBSw (1X PBS, pH 7,4 ; 0,1% Tween 20),
- 3x 5 min dans PBSw.

Les embryons sont ensuite traités avec 2 ml de PBSw contenant 10 µg/ml de protéinase K, pendant 15 min à température ambiante, afin de perméabiliser les embryons et de favoriser la pénétration de la sonde. Ce traitement permet également d'éviter un excès de bruit de fond car la sonde a tendance à se fixer au mucus des embryons. Les embryons sont ensuite lavés 2x 5 min avec une solution 0,1M de triéthanolamine, pH 7,5. La solution est préparée à partir d'une solution stock (Sigma #T1377) et le pH est ajusté avec de l'acide chlorhydrique dilué. 5 µl d'anhydride acétique sont ajoutés et mélangés pendant 5 min, puis 5 µl d'anhydride acétique sont, de nouveau, rajoutés et mélangés pendant 5 min. Ces deux étapes permettent d'acétyler les groupements amines des protéines et réduire le bruit de fond. Les embryons sont ensuite rincés 2x 5 min dans une solution de PBSw. Les embryons sont fixés à nouveau 20 min dans 2 ml de solution de MEMFA et rincés 5 fois 5 min dans la solution PBSw. Après le dernier rinçage, 1 ml de solution PBSw est éliminé et 1 ml de tampon d'hybridation est ajouté. Le mélange est agité pendant 10 min. Puis le mélange est remplacé par 1 ml de tampon d'hybridation et incubé 10 min à 61°C. Le tampon est éliminé et 500 µl de tampon d'hybridation sont ajoutés et les embryons incubés pendant 3 h à 61°C.

4. Hybridation de la sonde

La sonde marquée à la digoxigénine est chauffée 5 min à 65°C, puis refroidie avant d'être diluée au 1/10^{ème} dans le tampon d'hybridation pour obtenir une concentration d'environ 1 µg/ml dans un volume final de 500 µl. Les embryons sont incubés avec la sonde pendant une nuit à 61°C. Les embryons sont ensuite rincés pendant 10 min avec le tampon d'hybridation puis 3x 20 min dans du tampon 2X SSC (0,3 M NaCl, 30 mM Citrate de Sodium) contenant 0,1% de CHAPS (C₃₂H₅₈N₂O₇S, Sigma). Les embryons sont ensuite incubés dans une solution 2X SSC contenant 10 µg/ml de RNase A à 37°C pendant 30 min sans agitation. Ce traitement permet d'augmenter la spécificité du signal en dégradant la sonde non hybridée aux ARNm cibles. Les embryons sont ensuite lavés 10 min dans la solution 2X SSC à température ambiante, 2x 1 h dans une solution 0,2X SSC contenant 0,1% CHAPS à 61°C et enfin, 2x de 10 min dans une solution MAB (100 mM Acide maléique, 150 mM NaCl) à température ambiante.

5. Révélation

Pour bloquer les sites aspécifiques, les embryons sont traités à 4°C pendant 1 h dans le tampon MAB contenant 2% d'agent bloquant (Roche). Les embryons sont ensuite incubés avec 500 µl de tampon MAB contenant 2% d'agent bloquant et 10% de sérum de chèvre (Sigma) qui a été incubé 30 min à 55°C et les embryons dans le tampon MAB contenant 2% d'agent bloquant, 10% de sérum de chèvre et l'anticorps anti-digoxygénine couplé à la phosphatase alcaline (Roche) est dilué au 1/2000^{ème} la nuit à 4°C. L'excès d'anticorps est éliminé par 5 lavages d'1h dans le tampon MAB à température ambiante. Les embryons sont incubés pendant 2x 15 min dans un tampon phosphatase alcaline (100 mM Tris pH 9,5, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0,1% Tween 20, 2 mM Levamisole) à température ambiante. Les embryons sont transférés dans une plaque 12 puits où ils sont incubés avec 500 µl de BM Purple, un substrat chromogénique de la phosphatase alcaline (Roche). La réaction de coloration se fait dans le noir à température ambiante ou à 4°C toute la nuit. La montée du signal est suivie à la loupe binoculaire.

Pour arrêter la réaction de coloration, les embryons sont incubés 5 min dans du tampon phosphatase alcaline, puis fixés pendant 1 h dans du MEMFA. Les embryons peuvent être conservés à -20°C dans l'éthanol.

B. Mise en évidence de l'apoptose (TUNEL)

Les embryons sont fixés dans une solution MEMFA et conservés dans du méthanol 100% à -20°C. Toutes les étapes sont effectuées dans des tubes Eppendorf de 2 ml, à température ambiante et avec des volumes de 2 ml. Les embryons sont réhydratés par des lavages successifs :

- 1x 5 min dans 75% de méthanol : 25% PBS,
- 1x 5 min dans 50% de méthanol : 50% PBS,
- 1x 5 min dans 25% de méthanol : 75 % PBS,
- 3x 5 min dans 1X PBS.

Les embryons sont lavés 15 min dans une solution 1X PBS contenant 0,2% de Tween 20 puis 30 min dans une solution 1X PBS contenant 0,5% de Tween 20. Puis les embryons sont rincés 2x 10 min dans du 1X PBS avant d'être pré-incubés dans le tampon 1X TdT (Roche) dilué dans du 1X PBS pendant 1 h. Les embryons sont alors incubés la nuit à 4°C dans du tampon 1X TdT contenant 0,5 µM de Dig 11-dUTP (Roche), 150 unités d'enzyme recombinante terminal desoxynucleotidyl transferase et 5 mM de CoCl₂. Les embryons sont rincés 2x 30 min dans du 1X PBS contenant 1 mM d'EDTA à 65°C et 2x 1 h dans du 1X PBS à température ambiante. Pour détecter les extrémités de l'ADN conjuguées à la digoxygénine, les embryons sont lavés 15 min dans une solution de PBT (1X PBS ; 0,1% Triton-X; 0,2% BSA) incubés 1 h à température ambiante dans du PBT contenant 20% de sérum de chèvre et enfin,

incubés à 4°C dans la même solution additionnée d'anticorps anti-digoxygénine couplé à la phosphatase alcaline (Roche) dilué au 1/2000^{ème}. Les embryons sont lavés quatre fois 30 min dans une solution PBT et 2x 5 min dans le tampon phosphatase alcaline. La réaction chromogénique se fait dans 1 ml de solution de tampon phosphatase alcaline contenant 0,45 µl de NBT et 3,5 µl de BCIP (Roche). Lorsque la coloration est suffisante, les embryons sont lavés trois fois 10 min dans une solution 1X PBS, fixés 1 h dans la solution MEMFA puis conservés dans une solution 1X PBS.

C. Immunohistochimie

1. Analyse de la prolifération

Les embryons sont fixés dans 2 ml de solution MEMFA et conservés dans du méthanol 100% à -20°C.

Les embryons sont réhydratés progressivement par des lavages successifs :

- 1x 5 min dans 75% éthanol : 25% 1X PBS,
- 1x 5 min dans 50% éthanol : 50% 1X PBS,
- 1x 5 min dans 25% éthanol : 75% 1X PBS.

Les embryons sont ensuite traités avec 2 ml de solution 1X PBS contenant 10 µg/ml de protéinase K pendant 3 min à température ambiante, afin de perméabiliser les embryons puis lavés trois fois 5 min dans une solution 1X PBS. Les embryons sont rincés 2x 10 min dans une solution PBT (1X PBS ; 0,5% Triton-X100 ; 2 mg/ml BSA) avant d'être pré-incubés 4 h à température ambiante dans une solution PBT contenant 20% de sérum de chèvre.

Les embryons sont alors incubés la nuit à 4°C en présence de l'anticorps primaire de lapin anti-phospho-Histone H3 (Millipore) qui permet de détecter les cellules en phase M (mitose) dilué au 1/1000^{ème}, dans une solution PBT contenant 20% de sérum de chèvre. L'excès d'anticorps est éliminé par 5 lavages d'1 h dans une solution PBT à température ambiante. L'anticorps primaire est détecté par un anticorps secondaire anti IgG de lapin couplé à la phosphatase alcaline dilué au 1/500^{ème}, dans la solution PBT contenant 20% de sérum de chèvre, une nuit à 4°C. L'excès d'anticorps secondaire est éliminé par 5 lavages d'1 h dans la solution PBT. La réaction chromogénique se fait de la même façon que pour le TUNEL.

2. Immunomarquage des muscles et des nerfs de la face

Les muscles et les nerfs de la face ont été observés par immunomarquage avec les anticorps suivants :

- 12/101 : qui reconnaît une protéine exprimée dans la membrane des cellules somitiques différenciées (Developmental Studies Hybridoma Band),
- 3A10 : qui reconnaît les neurofilaments (Developmental Studies Hybridoma Band),
- CD57/HNK-1 : qui reconnaît les cellules neuroectodermiques (Sigma)

Anticorps primaire	Dilution	Anticorps secondaire	Dilution
12/101	1/30	Anti IgG Souris-HRP	1/200
3A10	1/20	Anti IgG Souris-HRP	1/200
HNK1	1/100	Anti IgG Souris-HRP	1/200

Tableau 14 : Conditions d'utilisation des anticorps pour l'immunomarquage.

Comme pour l'analyse de la prolifération, les embryons sont fixés dans du MEMFA et sont conservés dans du méthanol à -20°C.

Les embryons sont réhydratés progressivement dans différents bains successifs :

- 1x 10 min dans 80% méthanol : 20% H₂O,
- 1x 10 min dans 50% méthanol : 50% 1X PBS,
- 1x 10 min dans 20% méthanol : 80% 1X PBS.

Les embryons sont ensuite rincés pendant 15 min dans une solution de PBT (PBS contenant 2 mg/ml de BSA et 0,1% de Triton-X100). Les embryons sont alors incubés 1 h à température ambiante dans 500 µl de solution de PBT contenant 10% de sérum de chèvre avant d'être incubés la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire.

Les embryons sont lavés 3x 2 h dans la solution PBT avant d'être incubés dans 500 µl de solution de PBT contenant l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase de radis noir (HRP) toute la nuit à 4°C. Les embryons sont lavés 3x 2h dans la solution PBT et la révélation est réalisée avec du DAB (Sigma Fast 3, 3'-Diaminobenzidine tablettes, Sigma). Le signal apparaît au bout de 5 min à l'obscurité et la réaction est arrêtée par un lavage de 5 min dans de l'eau.

D. Dépigmentation des embryons

Après les expériences d'hybridation *in situ*, de TUNEL ou d'immunohistochimie, la dépigmentation des embryons se fait à l'aide d'une solution de dépigmentation (1X SSC, 5% formamide, 10% H₂O₂). Les embryons sont placés dans la solution de dépigmentation et exposés de 30 min à 1 h sous une lampe jusqu'à disparition des pigments. La réaction de dépigmentation est arrêtée en plaçant les embryons dans du 1X SSC.

E. Coloration du cartilage au bleu d'alcian

Les embryons sont fixés pendant 1 h dans la solution de MEMFA à température ambiante puis ils sont déshydratés par 5 lavages successifs de 5 min dans de l'éthanol 100%. Les embryons sont ensuite incubés dans la solution d'alcian (30% acide acétique, 70% éthanol, 20 mg bleu d'alcian) pendant 3 jours, sous agitation, à température ambiante.

Les embryons sont alors lavés trois fois 15 min dans de l'éthanol à 95% avant d'être progressivement réhydratés à température ambiante par des lavages successifs :

- 1x 10 min dans 20% glycérol dans 2% KOH,
- 1x 10 min dans 40% glycérol dans 2% KOH,
- 1x 10 min dans 60% glycérol dans 2% KOH.

Les embryons sont rincés 3x 10 min dans une solution 2% KOH et de nouveau lavés à température ambiante pendant 1 h dans les mêmes solutions que la réhydratation (20% glycérol-2%KOH ; 40% glycérol-2% KOH ; 60% glycérol-2% KOH). Les embryons sont laissés une nuit dans une solution de 80% glycérol dans 2% KOH et sont conservés dans cette solution à 4°C.

F. Test de migration

La migration des cellules des crêtes neurales a été analysée *in vitro*. Les deux blastomères d'un embryon au stade deux cellules sont injectés avec les ARNm ou les morpholinos et avec l'ARNm de la *GFP* utilisée comme traceur de l'injection. Les embryons marqués à la GFP sont sélectionnés au stade neurula puis les explants des crêtes neurales d'embryons au stade 17 sont disséqués (Theveneau et al 2010).

Les explants sont déposés dans une plaque de 24 puits recouverts de fibronectine de plasma bovin (10 µg/ml ; Sigma) et cultivés dans du milieu DFA (53 mM NaCl, 5 mM Na₂CO₃, 4,5 mM K gluconate, 32 mM Na gluconate, 1 mM MgSO₄, 1mM CaCl₂). Les explants des crêtes neurales sont photographiés individuellement jusqu'à 18 h après la mise en culture.

La migration des cellules des crêtes neurales est mesurée en comparant l'aire de la surface relative des explants à 18 h par rapport à celle après 3 h de culture en utilisant le programme Image J (<https://rsb.info.nih.gov/ij/features.html>).

G. Analyse des ARN par RT-PCR

1. Extraction des ARN totaux de xénope

Les ARN totaux d'embryons ou d'explants sont homogénéisés dans 300 µl de tampon TNES (20 mM Tris/HCl pH 7,5 ; 300 mM NaCl ; 30 mM EDTA ; 1%SDS). L'homogénat est incubé 30 min à 37°C en présence de protéinase K à 250 µg/ml. Après l'incubation, les protéines sont extraites par un volume de phénol puis par un volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (24/25/1). Les ARN sont précipités 30 min à -20°C dans 2,5 volumes d'éthanol absolu contenant 10 µl de glycogène. Le mélange est centrifugé puis le culot d'ARN est repris dans 90 µl d'eau auxquels sont ajoutés 20 unités d'inhibiteur de RNase, 1 unité de DNase RQ1 (Promega) et 10 µl de tampon DNase 10X RQ1 (Promega). Le mélange est incubé 30 min à 37°C. Les échantillons sont à nouveau traités à la protéinase K puis précipités à l'éthanol. Après centrifugation, le culot est repris dans de l'eau et la qualité ainsi que la concentration des ARN totaux sont estimées sur un gel d'agarose 1% dans du tampon 1X TBE.

2. RT-PCR

a. Transcription inverse

La transcription inverse est réalisée à partir d'1 µg d'ARN total dans un volume final de 20 µl. L'ARN est incubé 5 min à 65°C dans un volume de 13 µl d'eau contenant 200 ng d'amorces aléatoires (Promega). Puis sont ajoutés 4 µl du tampon transcriptase inverse 1X, 1 mM dNTPs, 40 unités d'inhibiteur de RNases et 200 unités de M-MLV transcriptase inverse (Promega). Après 1h d'incubation à 37°C, la réaction est stoppée 5 min à 64°C et 30 µl d'eau sont ajoutés avant de stocker les ADNc à -20°C.

b. Amplification des ADN complémentaires

L'amplification des ADNc est réalisée à partir de 2 µl d'ADNc dans un mélange final de 25 µl, contenant 5 µl de tampon Gotaq, 0,2 mM de dNTPs, 20 pmoles de chaque oligonucléotide et 2,5 unités de Taq polymérase (Promega). Après une étape de dénaturation de 2,5 min à 94°C, plusieurs cycles d'amplification sont effectués. Chaque cycle est composé d'une étape de dénaturation de 30 s à 94°C, d'une étape d'hybridation de 30 s à une température dépendante de la séquence des amorces utilisées et d'une étape d'élongation à 72°C dont la durée est fonction de la taille du fragment à amplifier, la Taq polymérase utilisée ayant une vitesse moyenne d'amplification de 1 kb par min. Nous avons réalisé entre 25 et 30 cycles selon le gène étudié. Les séquences des amorces utilisées pour les PCR sont présentées dans le tableau. Les produits PCR de la réaction sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose 1% dans une solution 1X TAE.

Oligonucléotide	Séquence de 5' en 3'	Oligonucléotide	Séquence de 5' en 3'
ESR1	sens GGATTACAAGCAAGGGTTC antisens TCCCATAGGATAACGTTCAT	Vgll2	sens GAAGATGCAGGAAGCACCAG antisens CCAAAATGATGGTGGGAAGC
FoxD3	sens CTGCCCTCCTCTGAAGTGAC antisens TTGACGTGTTACCTGCACAG	Vgll3	sens GCGCGGATCCACACTTGCAATGAGTTGTCTGG antisens GGTGGCATTAAACAGATGTCC
HoxB9	sens AAAGGGACTGAAGGAACCGC antisens TCTTCATCTTCATCCTTCGG	Vgll4-LA	sens ATTGGTTCACGCAGATGACG antisens CACGTAATCACAGAAGGTCTG
Krox 20	sens AACCGCCCCAGTAAGACC antisens GTGTCAGCCTGTCCTGTTAG	Vgll4-LB	sens GCTCAACTACCAGTATCTGC antisens CACGTAATCACAGAAGGTCTG
MyosinX	sens TGATCTACACGAAGCCTCC antisens GGAGTTGTTGTTGTACACGG	Vgll4-SA	sens GAATCTCTCGGGAAGACTCG antisens CACGTAATCACAGAAGGTCTG
N-cadhérine	sens CAGGGACCACTTGAAGCACT antisens TGCCGTGGCCTTAAAGTTAT	Zic 1	sens AACCACATCAGAGTGCACAC antisens TTGGACGTGTGATGTACTGC
N-cam	sens CACAGTTCACCAAATGC antisens GGAATCAAGCGGTACAGA	Ets-1	sens GCAGCCAGTCATCTTTCAACAGCC antisens TCAGCACGGTCCCGCACATA
N-tubuline	sens ACACGGCATTGATCCTACAG antisens AGCTCCTTCGGTGTATGAC	Gapdh	sens TCTTCACCACCATGGAGAAGG antisens GTTGTCATGGATGACCTTGGC
ODC	sens GTCAATGATGGAGTGTATGGATC antisens TCCATTCCGCTCTCCTGACCAC	Tead1	sens AATCCCACCGCCAAAATTGAGC antisens TACCATACATTTGCCTTCGTCT
Otx2	sens GGATGGATTTGTTGCACCAAGTC antisens CACTCTCCGAGCTCACTTCTC	Vgll3 humain	sens AAAGCAAGATGGGGCTAACCC antisens TCCAAAAGGAAGTTGGGAACTATTC
Pax3	sens CTGTGTCTGATCCAAGCAAC antisens CATATGTTCCAGTCTCTGGC	Yap	sens CCTGCGTAGCCAGTTACCAA antisens CCATCTCATCCCACTGTTC
Pcdh 18	sens CATATGTTCCAGTCTCTGGC antisens GGCTGTTATCATTTGGAGTCC	Tbx1	sens CACCGTGCAGCTGGAGATGAAAGC antisens ATCGGCCATGGGATCCATCCC
PCNS	sens TAAGTGGAATTTCTCATGTCC antisens TCTCTTTCATACTCTGCCCCG	Myf5	sens CTATTCAGAATGGAGATGGT antisens GTCTTGGAGACTCTCAATA
Slug 2	sens TCCCGCCCACTGAAAATGCCACGATC antisens CGCTCCTAAAGATGAAGGGTATTCTT	EF1	sens CAGATTGGTGCTGGATATGC antisens ACTGCCTTGATGACTCCTAG
Twist1	sens AATGGCCAGCTGCAGTTATG antisens TAAGTGGCTTCAAGGCACG	EK	sens CACCAGAACACAGAGTAC antisens CAACCTTCCCATCAACCA

Tableau 15 : Séquences des amorces utilisées dans les expériences de RT-PCR

H. Analyses protéiques par Western-Blot

1. Extraction des protéines totales à partir d'embryons de xénope

L'extraction des protéines totales d'embryons de xénope s'effectue à 4°C. Les embryons sont repris dans un tampon d'extraction (50 mM Tris-HCl ; 125 mM NaCl ; 1% NP40 ; 2 mM EDTA) à raison de 10 µl de tampon par embryon. Le mélange est centrifugé 15 min à 10000g, le surnageant est récupéré et centrifugé à nouveau 2x 15 min à 10000g pour enlever les lipides. Le surnageant est prélevé et 1 volume de tampon de charge 2X (4% SDS, 10 mM Tris-HCl, 20% glycérol, 0,2% bleu de bromophénol, 10% β-mercaptoethanol) est ajouté. Les extraits protéiques sont conservés à -20°C.

2. Technique de Western-Blot

Les protéines totales sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant puis transférées sur membrane et hybridées avec l'anticorps spécifique. Les protéines totales reprises dans le tampon de charge sont chauffées 5 min à 90°C. Elles sont ensuite séparées par électrophorèse en un gel d'acrylamide-bisacrylamide dénaturant (gel SDS-PAGE contenant 0,1% de SDS) dans un tampon de migration contenant 28,8 g/l de glycine, 6 g/l de Tris-base et 0,1% de SDS. La migration se fait à 100 volts jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel. Le gel d'acrylamide est composé d'un gel de concentration à 5% d'acrylamide-bisacrylamide (Acrylamide bisacrylamide 39 :1 5% ; 125 mM Tris-HCl pH 6,8 ; 0,1% SDS ; 0,1% TEMED ; 0,05% Ammonium persulfate) et d'un gel de séparation à 12% d'acrylamide-bisacrylamide (12% Acrylamide bisacrylamide 39 :1 ; 375 mM Tris-HCl pH 8,8 ; 0,1% SDS ; 0,1% TEMED ; 0,05% Ammonium persulfate).

Le transfert des protéines est réalisé en milieu semi-sec. La membrane de nitrocellulose (GE Healthcare Life Sciences) est préalablement humidifiée dans du tampon Bjerrum-Shafer-Nielsen (5,82 g/l Tris-Base, 2,93 g/l glycine, 0,375 g/l SDS, 20% éthanol). Les protéines sont transférées pendant 1h15 à 100 volts et le transfert du gel sur la membrane est contrôlé par une coloration au rouge Ponceau de la membrane.

Avant l'incubation avec les anticorps, les sites de fixation non spécifiques sont saturés en traitant la membrane pendant 1 h à température ambiante avec une solution de saturation contenant du TBSt (100 mM Tris-base pH8, 150 mM de NaCl, 0,1% tween 20) et 5% de lait en poudre dégraissé. L'anticorps primaire est dilué dans le tampon TBSt contenant 5% de lait en poudre. La membrane est incubée en présence de l'anticorps anti GFP dilué au 1 : 5000^{ème} (Clontech) la nuit à 4°C. Après hybridation, la membrane est rincée 3x 10 min dans la solution TBSt à température ambiante. La

membrane est ensuite mise en présence de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (HRP) pendant 1 h à température ambiante. Après 2 lavages de 10 min dans la solution TBSt et 2 lavages de 10 min dans une solution de TBS, la détection des protéines est réalisée avec le kit de révélation de la luminescence (ECLTM Western Blotting Analysis System AmershamTM). La membrane est exposée selon l'intensité du signal quelques secondes à plusieurs mins au contact d'un film photographique (AmershamTM Hyperfilm ECL).

I. Immunoprécipitation

Toutes les étapes se font sous agitation et à 4°C. Les embryons sont homogénéisés dans un tampon de lyse (50 mM Tris-HCl ; 150 mM NaCl ; 0,5% NP40 ; 1mM PMSF contenant des inhibiteurs de protéase, Roche) pendant 10 min à 4°C, puis le mélange est centrifugé plusieurs fois pour éliminer les lipides et le surnageant est récupéré.

Avant d'effectuer l'immunoprécipitation, les billes couplées à la protéine A sont préparées à 50%. 60 µl de billes (Sephadex) par échantillon sont prélevés et lavés trois fois dans du tampon de lyse. Le surnageant est éliminé et les billes sont incubées dans du tampon de lyse contenant 0,1% de BSA pendant 1 h. Les billes sont de nouveau lavées trois fois avec du tampon de lyse puis centrifugées et reprises dans 30 µl de tampon de lyse.

Les échantillons protéiques sont pré-absorbés avec 30 µl de billes à 50% pendant 1 h puis 1/10^{ème} du surnageant est prélevé et mis en présence de tampon de charge 2X (voir paragraphe H-1) et conservé à -80°C. Le reste du surnageant est incubé avec 1 à 3 µg d'anticorps pendant une h puis 30 µl de billes sont ajoutés et incubés pendant 1 h. Après centrifugation, le surnageant est éliminé et les billes sont lavées trois fois avec du tampon de lyse avant d'être mis en présence du tampon de charge 2X et conservées à -80°C.

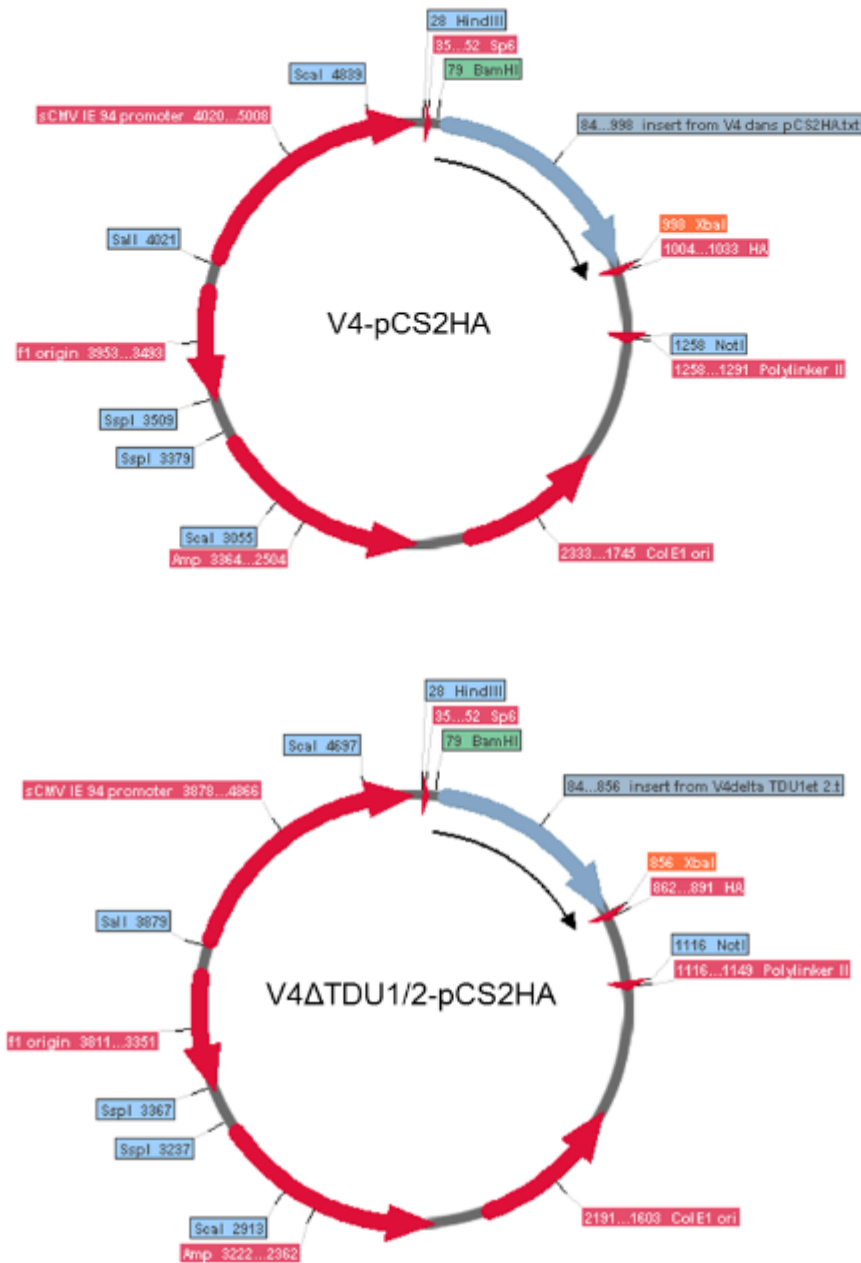
Les échantillons sont analysés par Western-Blot comme précédemment. Pour réduire les réactions des anticorps secondaires avec les contaminants de l'immunoprécipitation (chaînes lourdes et légères des IgG), le kit EasyBlot anti-mouse IgG (GeneTex) est utilisé. Les anticorps utilisés pour l'immunoprécipitation et le Western-Blot sont :

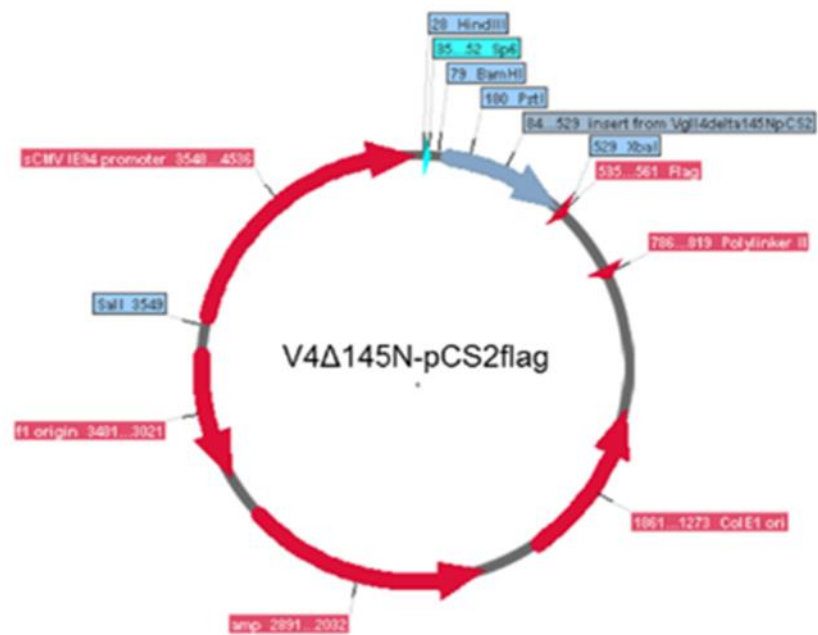
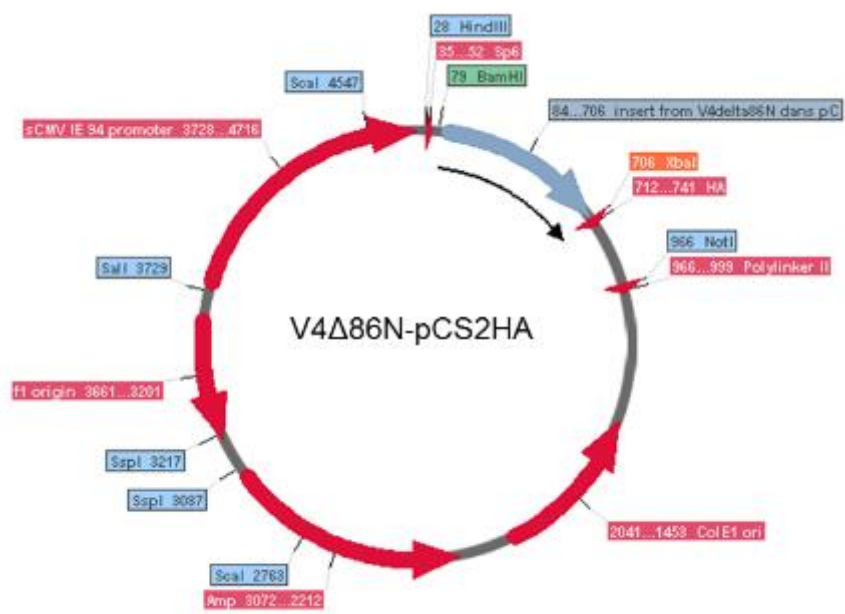
- anticorps de souris anti-HA (Covance, dilution au 1/1000^{ème}),
- anticorps de souris anti-myc (Sigma, dilution au 1/7000^{ème}).

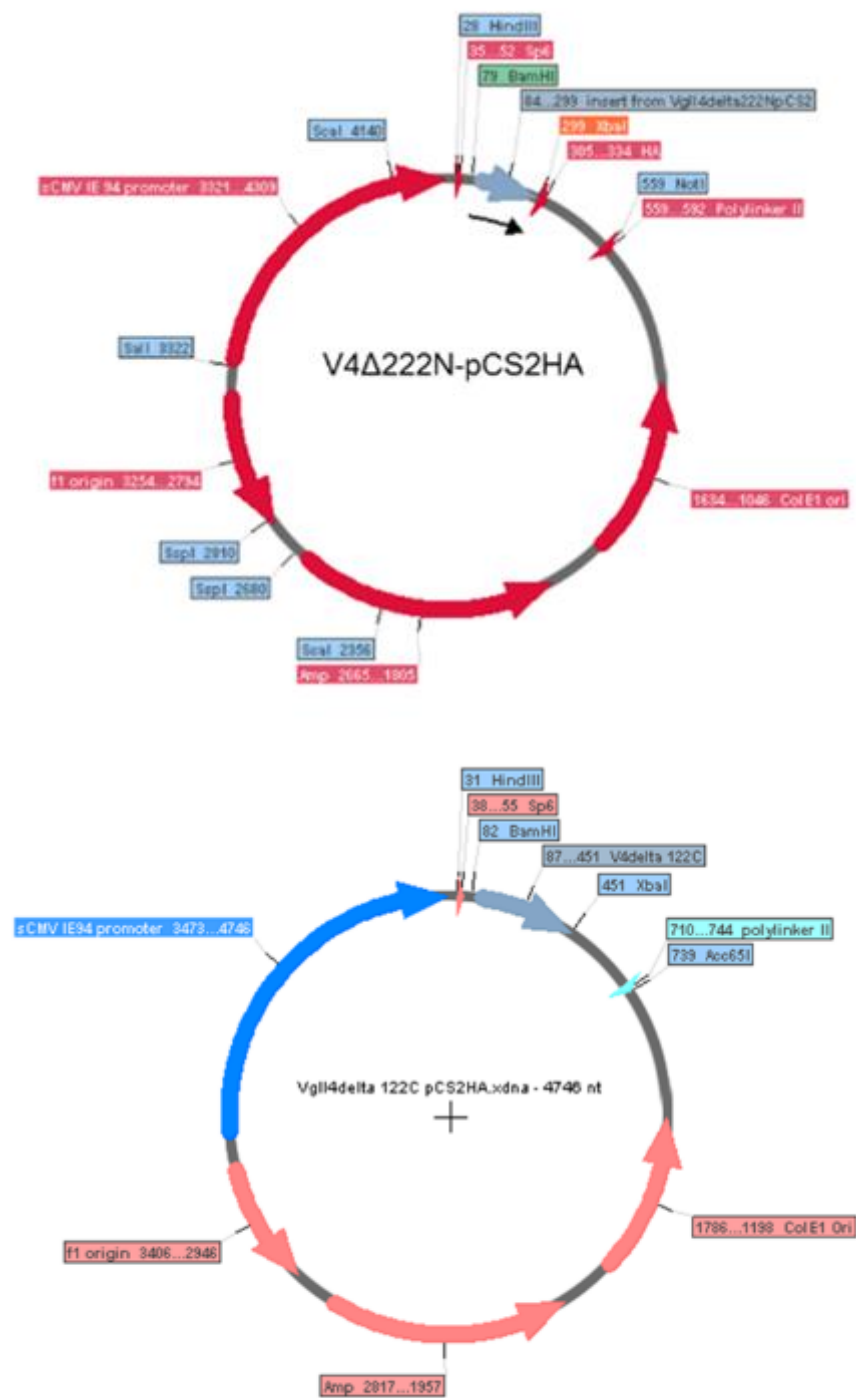
J. Analyse de l'activité luciférase

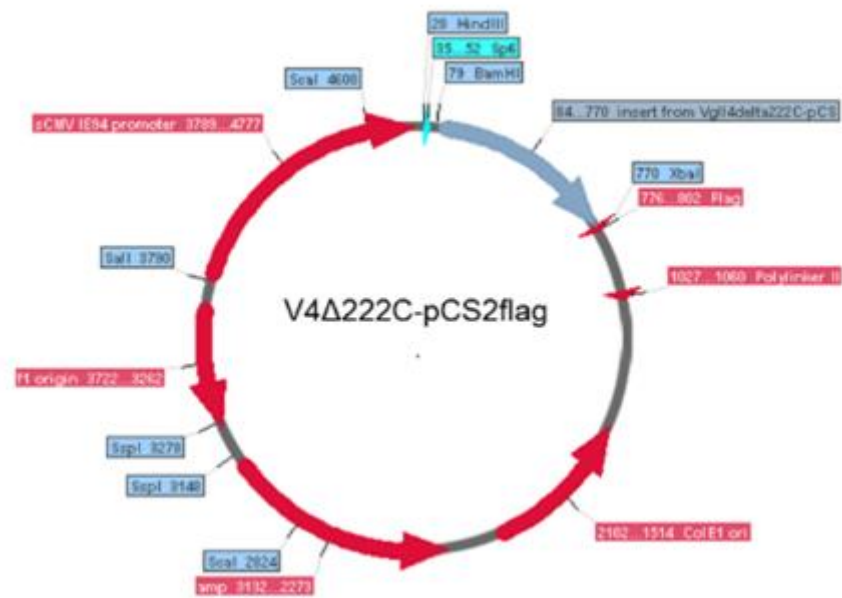
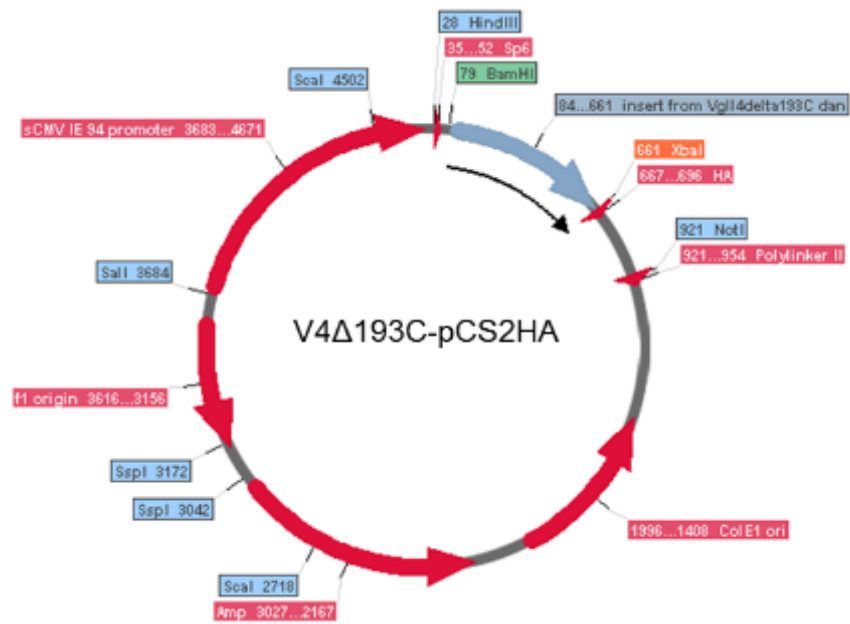
Pour analyser l'activité transcriptionnelle de TEAD, les plasmides pGL284Luc (Pasquet et al., 2007) et pRL-TK sont injectés avec les ARNm Vgll4, Tead ou YAP1 dans les deux blastomères d'un embryon de stade 2-cellules. Les embryons sont cultivés à 13°C et les explants des calottes animales sont disséqués sur les embryons de stade 9 et ils sont fixés à sec dans de l'azote liquide et conservés à -80°C. Les explants sont lysés dans un tampon de lyse (Dual Luciferase Kit, Promega) et l'activité luciférase est mesurée à l'aide du Varioskan[®] Flash (Thermo Fisher Scientific). L'activité relative de la luciférase est normalisée avec l'activité luciférase de la rénilla (produit du plasmide pRL-TK)

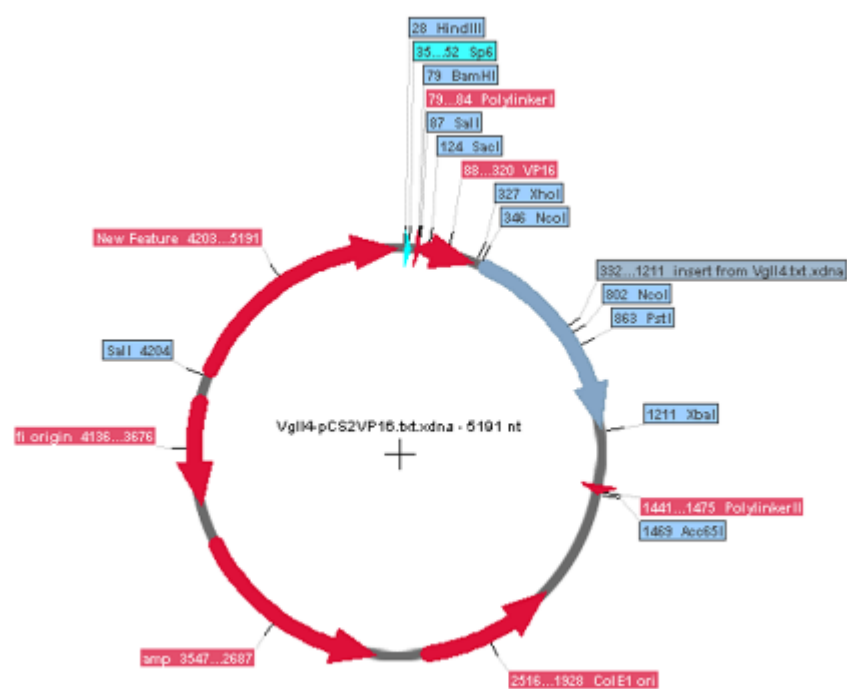
III. Représentation schématique des différentes constructions vgl4











Annexe 3 : Curriculum vitae scientifique

Communications scientifiques

Publications

- **From Vestigial to Vestigial-like: the Drosophila gene that has taken wing.**
Emilie SIMON, Corinne FAUCHEUX, Alain ZIDER, Nadine THEZE and Pierre THIEBAUD (IJDB soumis en juillet 2015)
- **Vestigial-like 3 is required for Xenopus development and interacts with ets1.**
Emilie SIMON, Pierre THIEBAUD, Sandrine FEDOU, Nadine THEZE and Corinne FAUCHEUX (Article en préparation)
- **Vestigial-like 4 regulates neurogenesis and neural crest cells formation.**
Emilie SIMON, Corinne FAUCHEUX, Sandrine FEDOU, Nadine THEZE and Pierre THIEBAUD (Article en préparation)

Communications écrites lors de congrès internationaux

Vestigial-like 4 is required for neural crest formation and neurogenesis in early *Xenopus* embryo. « 15th International Xenopus meeting » 24 au 28 Août 2014 à Pacific Grove (Californie)

Participation à des journées scientifiques

Communications écrites

Vestigial-like 4 is required for neural crest formation and neurogenesis in early *Xenopus* embryo. Présenté à la « Journée de l'école doctorale » 9 avril 2014 à Arcachon, prix du meilleur poster (1/80) et à la « Journée de la FR Transbiomed » 4 décembre 2014 à Bordeaux

Participation à des séminaires

UMR CNRS 5164

Projet de thèse 19 décembre 2013

Université libre de Belgique-Génétique du développement-Equipe du professeur Eric Bellefroid (juin 2015)

Vestigial-like 4 is required for neural crest formation and neurogenesis in early *Xenopus* embryo

University of East Anglia Equipe du docteur Grant Wheeler (6 novembre 2015)
Royaume-Uni

Vestigial-like 4 is required for neural crest formation and neurogenesis in early *Xenopus* embryo

Formations scientifiques et professionnalisantes

Monitorat (2013-2014) 64h équivalent TD

- Participation à l'encadrement des étudiants ainsi qu'à la préparation des TP « développement animal » de l'UE de Biologie Cellulaire et Développement Animal et des TP d'immunohistochimie de l'UE Méthodologie et Technologie.
- TD de l'UE de Biologie Cellulaire et Développement animal.

Formation (2012-2013)

- Formation à l'enseignement par l'enseignement à l'université de Bordeaux : 12h de formation théoriques et 20h de formation pratique (participation à des TP).
- Formation des doctorants interuniversitaires parcours enseignement à l'IUFM d'Aquitaine : 39h.

Associations (2012-2015)

- Membre actif de l'association des doctorants TBM doc's – Organisation de 3 journées et 6 soirées de rencontres scientifiques pour les étudiants.
- Membre actif de l'association Pint of Science –Organisation de 3 soirées de rencontre chercheur/public dans le cadre d'un pub – Mai 2014